

LUCIANA EBERHARDT ALVES

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBICO E
DO ANAERÓBICO NO CRESCIMENTO TUMORAL E CAQUEXIA EM RATOS
COM TUMOR DE WALKER 256**

IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES PARTICIPANTES NESTE PROCESSO.

CURITIBA

2008

LUCIANA EBERHARDT ALVES

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBICO E
DO ANAERÓBICO NO CRESCIMENTO TUMORAL E CAQUEXIA EM RATOS
COM TUMOR DE WALKER 256**

IDENTIFICAÇÃO DE MEDIADORES PARTICIPANTES NESTE PROCESSO.

Dissertação de mestrado apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Área de concentração em Fisiologia do Exercício, do Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cláudio
Fernandes.

CURITIBA

2008

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua fidelidade e amor incondicional.

Aos meus pais Mirian e Francisco por estarem sempre me incentivando aos estudos e servirem de exemplo em honestidade, dedicação, fé e perseverança. EU AMO VOCÊS!

Ao professor Luis Cláudio, meu verdadeiro "chefe", por ter acreditado em meu potencial e concedido à oportunidade de realizar este sonho. Obrigado pela orientação, apoio e confiança. Parabéns por ser um exemplo de pesquisador e docente com grande senso de justiça.

Aos meus irmãos Fábio e Marco por saberem o real significado da palavra "irmão". Obrigado pelo companheirismo sempre.

Ao meu anjinho amado Lauro que teve toda a paciência nesta fase "complicada" do mestrado e fez tudo parecer mais fácil! Você é um presente de Deus na minha vida!

A Carina, por ser a parceira ideal para todos os momentos deste mestrado, seja na hora de treinar os ratos, assistir as aulas ou madrugar nos dias de experimento. Obrigado pelos longos papos e por ter segurado a barra em muitos momentos. Cá, sem você não seria possível, valeu, amiga!!!

A Fabiola, Andressa e Ana e Katya, por toda a amizade incentivo e ajuda no dia-a-dia. Ao Diogo por ser meu professor de *Western blotting* (Mr. Gel) e pelas muitas risadas juntos. Ao Fernando pela sua ajuda valiosíssima nas análises do citômetro.

Aos amigos de Lab que foram fundamentais em todos os experimentos: Paulo, Sandro, Carine, Marcelo, Jaisson, Cris, Dani, Luis Alexandre, Rica, Gleisson, Everson, Sérgio, Naiara, Lia, Isa e Dalton. Muito obrigado, vocês são um verdadeiro time na hora em que mais precisamos!

Aos meus queridos amigos de todas as horas: Igor, Elis, Anderson, Val. A alegria de vocês é contagiante. Obrigado por sempre torcerem por mim!

A todos os meus amigos que passaram pela minha vida e, de alguma forma, me motivaram a sorrir e seguir meus sonhos.

Aos funcionários do Biotério e do Setor de Ciências Biológicas que me acolheram e ajudaram nas diversas etapas desta caminhada.

Aos professores Dr. Paulo Ivo H. Bittencourt Jr., Dr. Raul Osieck, Dra. Maria Gisele dos Santos, Dr. Reury Frank Pereira Bacurau, por dedicarem seu tempo lendo e avaliando minha dissertação. Obrigado por se disporem em colaborar para a melhoria deste trabalho.

**“Muitos são os planos no coração
do homem, mas o que prevalece é
o propósito do Senhor”**

Provérbios 19:21

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Câncer	01
1.2 Caquexia	03
1.3 Exercício físico e câncer	05
1.3.1 Exercício aeróbio e câncer	09
1.3.2 Exercício de força e câncer	10
1.4 Mecanismos de atuação do exercício físico no câncer	11
1.4.1 O papel do estresse oxidativo do exercício como indutor de apoptose	15
2. OBJETIVO	18
3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS	19
3.1 Amostra	19
3.2 Desenho do estudo	19
3.3 Instrumentos e procedimentos	20
3.3.1 Protocolos de treinamento	20
3.3.2 Procedimentos para as análises	22
3.4 Coleta de dados	27
4. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - Albumina bovina sérica
cpm – contagem por minuto
COX - ciclooxigenase
DNA- ácido desoxirribonucleico
EDTA – ethylenediaminetetracetic acid
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
EPM - erro padrão da media
EROs - espécies reativas de oxigênio
FOX- ferrous oxidation xylenol orange
FITC - Fluorocromo fluoresceína
FSC – Forward Scatter
GPX- Glutathione peroxidase
CAT- Catalase
HRP - Horseradish peroxidase
IGF-1 - Fator de crescimento parecido com a insulina
IGFBP-1 - Proteína ligante ao IGF-1
IAP- Proteínas inibidoras de apoptose
IL-1 – Interleucina 1
IL-6 - Interleucina 6
IL-10 - Interleucina 10
I κ B - Proteína inibitória do fator de transcrição nuclear κ B
kDa- Kildalton
LMF - fator mobilizador de lipídeos
MAPK- mitogen-activated protein-kinase
NAD⁺ - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo
NADH - Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-forma reduzida.
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NK - células natural killer
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS - Tampão Fosfato-salina
PGE₂- Prostaglandina E₂

PI3K- Phosphoinositide 3-kinase

PIF - Fator indutor de proteólise

Rpm - Rotação por minuto

SDS-page - Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.

SOD - Superóxido dismutase

SSC – side scatter

TAGs - triacilglicerois

TCA - ácido tricloroacético

TEA – Trietanolamina

TEMED: tetramethylethylenediamine

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

TPP- Trifenilfosfina

VO_{2max} - Consumo máximo de oxigênio

7AAD - 7-Amino-actinomycin D

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELAS

TABELA 1. Mecanismos biológicos que podem estar envolvidos na relação entre atividade física e câncer	06
TABELA 2. Protocolo de treinamento de salto	20
TABELA 3. Protocolo de treinamento de natação.	21
TABELA 4: Massa corporal (g) dos animais no dia em que foram inoculadas as células tumorais e no final do experimento, os valores de ganho de peso, massa tumoral, massa da carcaça (massa corporal – massa tumoral) e o ganho de massa real.	30

FIGURAS

FIGURA 1. Mecanismos indutores de apoptose	15
FIGURA 2. Concentração de lactato (mmol/L) após a sessão de exercício de salto ou natação	29
FIGURA 3. Massa tumoral dos ratos dos grupos sedentário, submetidos ao exercício de saltos e exercício de natação.. . . .	32
FIGURA 4. Concentrações plasmáticas de lactato (mmol/L).	33
FIGURA 5. Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL).	35
FIGURA 6. Proliferação de célula tumoral <i>ex-vivo</i> (cpm).	36
FIGURA 7. Lipoperoxidação no tecido tumoral (nmol/mg de proteína).	37
FIGURA 8. Distribuição das células tumorais quanto a seu tamanho e granulosidade e quanto a sua marcação com 7AAD e Anexina V.	39
FIGURA 9. Porcentagem de células mortas por necrose.	41
FIGURA 10. Porcentagem de células em apoptose.	42
FIGURA 11. Expressão da proteína Bax no tecido tumoral.	44
FIGURA 12. Expressão da proteína Bcl-2 no tecido tumoral.	45
FIGURA 13 Expressão da proteína PIF no tecido tumoral.	46

RESUMO

O câncer hoje é compreendido não como uma única doença, mas como um conjunto de mais de 400 distintos diagnósticos histológicos. Cada diagnóstico está associado com comportamentos biológicos específicos, porém as manifestações clínicas dos pacientes são similares, como a síndrome da caquexia. Estima-se que até o ano de 2020 existirão 15 milhões de novos casos de câncer em cada ano. Modificação dietética e atividade física regular são elementos significativos na prevenção e controle do câncer. Estudos em modelos animais demonstraram que o exercício físico pode prolongar a vida dos indivíduos treinados e diminuir a taxa de crescimento tumoral. Portanto o propósito do presente estudo foi analisar e comparar o efeito de dois tipos de exercício físico diferentes, um de natação e outro de salto na água, sobre o crescimento tumoral e caquexia em ratos portadores do tumor de Walker 256 e apontando para as proteínas intracelulares envolvidas neste processo. A amostra foi composta por ratos Wistar machos dividida em 6 grupos experimentais: ratos sedentários, treinados com exercício de salto, treinados com exercício de natação, sedentários e portadores do tumor de Walker 256, treinados com exercício de salto e portadores do tumor, treinados com exercício de natação e portadores do tumor. Os animais foram treinados quatro vezes por semana durante 8 semanas, sendo que na 6ª semana foram inoculadas células tumorais de Walker 256 nos ratos dos grupos que seriam analisados sob este parâmetro. Ao final do período experimental os ratos foram ortotansados e coletados tecidos e sangue para análise da massa corporal do rato, peso do tumor, lactatemia e triacilglicerolemia plasmática, proliferação *ex-vivo* das células tumorais, percentual de apoptose e necrose das células tumorais, lipoperoxidação em tecido tumoral, expressão de PIF, Bcl-2 e Bax em tecido tumoral. O treinamento com exercício físico tanto de salto quanto de natação, foram hábeis em combater a caquexia e diminuir a massa tumoral. Ambos exercícios físicos foram eficientes em evitar a perda de peso, característica da síndrome de caquexia, bem como na redução do peso do tumor, da hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia e da proliferação de célula tumoral *ex-vivo*. Nos dois tipos de exercício a concentração de lipoperóxidos, encontrada no tecido tumoral, foi maior que a dos ratos sedentários, porém o exercício aeróbico induziu ao aumento 2 vezes maior que o observado no grupo anaeróbico. Essa diferença de resultado entre os animais do grupo de salto em relação aos da natação manteve-se nos resultados de apoptose e necrose das células tumorais. Ainda, o exercício físico mostrou ser capaz de aumentar a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuir a expressão da anti-apoptótica Bcl-2, bem como de PIF, reduzindo a perda e massa muscular. Palavras-chave: Câncer, caquexia, exercício físico, aeróbico, anaeróbico, tumor de Walker 256.

ABSTRACT

The cancer is nowadays understood not as a single disease, but as a group of more than 400 different histological diagnoses. Each diagnosis is associated with specific biological behavior, but the clinical manifestations of patients are similar, such as the syndrome of cachexia. It is estimated that by the year 2020 there will be 15 million of new cases of cancer each year. Alterations in the diet and regular physical activity are significant agents in the prevention and control of cancer. Studies in animal models have shown that exercise can increase life span of individuals trained and decrease tumor growth rate. The main goal of this study is to investigate and compare the effect of two different types of exercise (one from swimming and one from jumping in the water) on tumor growth and cachexia in rats bearing Walker 256 tumor, and also identify the possible intracellular proteins involved in such process. Male Wistar rats were divided in 6 groups experimental: sedentary, trained with the jump exercise, trained with swimming exercise, sedentary tumor-bearing, exercised with jump tumor-bearing, and exercised with swimming tumor-bearing. The animals were trained four times a week during 8 weeks. At the 6th week of training some rats were inoculated with Walker 256 tumor cells. At the end of the experimental period, rats were killed and tissues and blood were harvested. Body weight, tumor weight, plasma lactatemia and triacylglycerolemia, *ex-vivo* proliferation of tumor cells, percentage of apoptosis and necrosis of the tumor cells, lipid peroxidation in tumor tissue, expression of PIF, Bcl-2 and Bax in tumor tissue were measured. Jump exercise as well as swimming were able to fight cancer cachexia and reduce tumor mass. Both exercise were effective in preventing body weight loss a characteristic of cachexia syndrome, as well as reducing the tumor weight, hyperlactacidemia, hypertriacylglycerolemia and proliferation of tumor cells *ex vivo*. In both types of exercise the amount of lipid peroxidation in the tumor tissue was higher than in sedentary rats, but in the aerobic exercise group there was an increase by 2-folds when compared to anaerobic group. The same was observed, regarding to jump in relation to swimming exercise upon apoptosis and necrosis of the tumor cells. Also, the exercise was able to increase the expression of the pro-apoptotic protein Bax and decrease the expression of anti-apoptotic Bcl-2, as well as PIF, reducing loss and muscle mass.

Keywords: cancer, cachexia, exercise, aerobic, anaerobic, Walker 256 tumor.

1. INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer - Brasil (INCA, 2006), estimou que no Brasil para o ano de 2006, deveriam ocorrer aproximadamente 472 mil novos casos de câncer, sendo câncer de pele (não-melanoma) o mais comum, seguido pelo câncer de mama, próstata, pulmão, cólon e reto. Estima-se que até o ano de 2020 existirão 15 milhões de novos casos de câncer em cada ano. Diante desse quadro, muitos estudos estão sendo realizados visando identificar possíveis causas do aumento desordenado das muitas formas de câncer.

Fatores carcinogênicos são responsáveis pela transformação de célula normal em célula anormal a qual se prolifera sem controle até a total debilidade do portador (FERNANDES, 1995). O câncer hoje é compreendido não como uma única doença, mas como um conjunto de mais de 400 distintos diagnósticos histológicos. Cada diagnóstico está associado com comportamentos biológicos e modelos de expansão específicos. Apesar da grande diversidade do câncer, há notáveis similaridades nas manifestações clínicas de pacientes com a doença. Mesmo pacientes sem metástases experimentam efeitos sistêmicos tais como anorexia e caquexia (DUNLOP & CAMPBELL, 2000).

Observando o quadro de prevenção e tratamento do câncer, acredita-se que intervenções para preservar a massa muscular têm importantes implicações clínicas e valor funcional em termos de melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com câncer (HESPEL et al., 2001; AL-MAJID & MCCARTHY, 2001).

O exercício é recomendado pela Organização Mundial de Saúde - OMS (2005) e pelo *American College of Sports Medicine* - ACSM (1999) para a maioria das populações, incluindo adolescentes, adultos, idosos e indivíduos com doenças crônicas.

1.1 Câncer

Câncer é o termo abrangente para designar crescimento celular descontrolado (PASTERNAK, 2002). Basicamente se desenvolve quando há falha nos processos que induzem a divisão celular, defeito no controle do ciclo

de divisão celular e/ou desequilíbrio no controle da morte celular programada (apoptose). A célula cancerosa é uma célula somática com mutações acumuladas em diferentes genes ou grupos de genes, resultando em perda do controle de proliferação celular. Como consequência pode haver, em alguns casos, formação de massa celular denominada tumor, com capacidade ilimitada de crescimento (PASTERNAK, 2002).

Os tumores formados podem ser benignos ou malignos. Os tumores benignos são revestidos por cápsula fibrosa que garantem sua retirada sem maiores danos ao organismo. Entretanto, os tumores malignos têm a propriedade de entrar na corrente sanguínea e vasos linfáticos, expressando formas secundárias de tumor ou metástases em outros sítios do corpo (ALBERTS et al, 1997). Todos os tumores dependem de suporte estrutural, nutricional, vascular e em alguns casos, até hormonal, que são supridos pelo próprio organismo, de modo a se comportarem como parasitas que depletam as reservas do hospedeiro (CURI, 2000).

Geralmente, alguns tumores competem com o hospedeiro por nutrientes, provocando diversas manifestações clínicas, sendo as mais comuns a astenia, anorexia, perda de peso, saciedade prematura e anemia. Assim, o desenvolvimento tumoral pode induzir a debilidade do organismo hospedeiro (TISDALE, 2004).

Um dos modelos animais mais utilizados para se estudar em ratos Wistar é o tumor de Walker 256, caracterizado como carcinosarcoma, identificado pela primeira vez em 1928 na mama de uma rata prenha (BLACK, J.M. et al, 1994).

George Walker constatou que o crescimento do tumor diminuiu durante o período de lactação, entretanto, voltou a crescer rapidamente, confirmando-se que o mesmo provinha das mamas (EARLE, 1935). Posteriormente, AGOSTINO E CLIFFTON (1967) descreveram a passagem do tumor da forma sólida para a ascítica. Assim, as células tumorais na forma ascítica poderiam, novamente, ser injetadas intraperitonealmente em outros animais que sempre desenvolviam o tumor ascítico. Estas mesmas células poderiam ser injetadas em diferentes órgãos e tecidos, sempre com o desenvolvimento de tumor sólido (CALDAROLA et al, 1968). O tumor foi transplantado em ratos Sherman por inoculação subcutânea, entre os anos de 1953 e 1954, o qual se tornou

palpável em uma semana, levando à morte após seis semanas (EARLE, 1935; ELSEN, 1940). O tumor de Walker apresenta-se em dois subtipos: tipo A metastizante, que leva à morte do animal portador em aproximadamente 27 dias; e o tipo B que não forma metástase, mas que por sua vez, induz caquexia precoce ao portador, levando-o à morte em 15 dias.

Desde sua descoberta em 1928, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos de câncer e de caquexia induzida pelo tumor, por ser espécie-específica para ratos e facilmente transplantada (FERNANDES et al, 1995). Além disso, causa importantes mudanças metabólicas e eletrolíticas no animal (BOECKH-HAEBISCH, E.M. et al, 1998; SEELAENDER M.C. et al, 1996), bem como alterações hormonais como hipoinsulinemia, que contribuem no estabelecimento do estado de caquexia (FERNANDES, et al, 1990,1991).

1.2 Caquexia

Pacientes com doenças avançadas freqüentemente perdem seu apetite, diminuem o peso e ficam profundamente cansados e fracos, com dificuldades de executar tarefas básicas. Isso pode ser devido a manifestação da síndrome da caquexia. O balanço nitrogenado reduzido na caquexia é resultado da diminuição do anabolismo e aumento do catabolismo, a presença simultânea dos dois efeitos resulta em rápida atrofia muscular. Acredita-se que isto é mediado pela ação de fatores de crescimento e citocinas. De fato, as concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) encontram-se aumentadas em alguns modelos animais com quadro caquético, enquanto que o IGF (Insulin Like Growth Factor), que age potencialmente na regulação do desenvolvimento e manutenção muscular, se apresenta suprimido.

O quadro de catabolismo intenso tem muitas implicações para os pacientes, incluindo: prejuízos na respiração, na sua mobilidade e na eficácia nos tratamentos, que podem culminar em altos níveis de morbidade e mortalidade (SAINI, et.al., 2006).

Dentre os sinais e sintomas que caracterizam o processo neoplásico, está a caquexia, que consiste em anorexia, perda progressiva de peso, intenso catabolismo de carboidratos e proteínas debilitando o organismo e diminuindo

a qualidade de vida do portador (BARBER e FEARON, 1999; ARGILÉS, 2005), Diversos estudos sobre câncer e caquexia demonstraram que a presença e o crescimento do tumor está também associado à má nutrição, que somada a outros fatores, induz o portador à caquexia. A competição existente entre tumor e hospedeiro acelera os distúrbios metabólicos, permitindo a depleção tanto das reservas de gorduras como às de tecido muscular (ARGILÉS et al, 2003).

A prevalência da caquexia é alta, mas é dependente do tipo de tumor e pode chegar a metade dos pacientes com câncer. A diminuição da massa muscular e gordura, que ocorre nesses pacientes, podem ser diretamente causadas por fatores secretados pelo tumor ou indiretamente devido a resposta do hospedeiro à presença do tumor. (TISDALE, 2004). Participam também no desenvolvimento deste quadro a hipoinsulinemia, o aumento da concentração de citocinas e dos hormônios contrarreguladores: cortisol, glucagon e catecolaminas (ARGILÉS et al, 1997; FERNANDES et al. 1991). A maioria dos tumores sólidos depende quase que exclusivamente do metabolismo anaeróbico da glicose como sua principal fonte energética, gerando lactato. Em condições de catabolismo pode ocorrer a conversão de lactato em glicose, no fígado, pela gliconeogênese, processo conhecido como ciclo de Cori, que se encontra aumentado em pacientes com câncer (DUNLOP, 2000; BARBER, 1999; TISDALE, 2000).

Portanto, o estabelecimento da caquexia é detectado pela presença de hipoglicemia, hiperlactatemia, hipertriacilglicerolemia, redução do conteúdo de glicogênio e perda de peso (PINTO et al, 2004).

Várias citocinas são liberadas pelo organismo hospedeiro como mediadores do processo caquético, dentre elas estão o TNF- α (fator de necrose tumoral- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e interferon- γ (IFN- γ). Altas concentrações de TNF- α , IL-1 e IL-6 têm sido encontradas em alguns pacientes com câncer e a concentração dessas citocinas parece relacionar-se com o progresso do tumor (ARGILÉS, 2005a).

Existem ainda substâncias liberadas pelo próprio tumor que também estariam envolvidas no processo caquético. Esses componentes são conhecidos como fator indutor de proteólise (PIF) e fator mobilizador de

lipídeos (LMF). Estes fatores induzem diretamente a proteólise e a lipólise, não somente *in vivo*, mas em preparações de músculos isoladas (TISDALE, 2005).

O PIF foi pela primeira vez identificado como um polipeptídeo glicosilado usando um anticorpo clonado de esplenócitos de camundongos transplantados com o adenocarcinoma MAC16. Este anticorpo liga-se a uma glicoproteína sulfatada (24 kDa) que está presente na urina de pacientes com caquexia relacionada ao câncer. O PIF é capaz de induzir quebra de tecido muscular *in vitro* e *in vivo*, via NFκB pela ativação do sistema ubiquitina-proteossoma (SKIPWORTH, R.J.E. ET. AL., 2007). O PIF parece ter efeito direto na inibição da captação de glicose pelo músculo esquelético (ARGILÉS, 2005), contribuindo para perda de peso com decréscimo da síntese e aumento da degradação protéica (TISDALE, 2005). O LMF produz perda de tecido adiposo acompanhado com aumento da expressão ubiquitina, uma das vias responsáveis pela proteólise (TISDALE, 2005).

1.3 Exercício físico e câncer

É consenso entre muitos autores que o exercício físico promove o bem-estar e a saúde nas pessoas que o praticam, beneficiando os sistemas circulatório, respiratório, imunológico, regulando o metabolismo energético e a liberação de diversos hormônios e outras substâncias que podem influenciar em quadros patológicos, atenuando fatores de risco relacionados ao sedentarismo e obesidade (RADAK et. al., 1999).

A modificação dos hábitos alimentares e a atividade física regular são elementos significativos na prevenção e controle do câncer. Em contraposição, sobrepeso e obesidade são fatores de risco para o desenvolvimento de câncer (OMS, 2005).

Evidências dos efeitos benéficos da atividade física sobre a incidência de câncer estão se acumulando rapidamente. Existem mais de 250 estudos que examinaram a atividade física e prevenção de câncer e o consenso em geral apontam que a atividade física está convincentemente associada à redução do risco de desenvolver câncer de cólon e mama, provavelmente vinculada com a redução de risco do câncer de endométrio e possivelmente com a redução do risco de câncer de próstata e de pulmão (COURNEYA; FRIEDENREICH, 2007). Os autores Friedenreich e Orenstein conduziram em 2002, uma revisão na literatura sobre atividade física e câncer, onde cerca de 170 estudos epidemiológicos observacionais de atividade física e câncer foram citados. Um resumo dos principais achados desta revisão sobre os mecanismos biológicos que podem estar envolvidos na associação entre atividade física e câncer está apresentado na tabela 1.

TABELA 1. Mecanismos biológicos que podem estar envolvidos na relação entre atividade física e câncer.

Local do câncer	Possíveis mecanismos envolvidos	Análise
--------------------	------------------------------------	---------

Cólon	Diminuído tempo de trânsito gastrointestinal	A atividade física aumenta a motilidade intestinal e reduz o tempo de exposição da mucosa a carcinógenos
	Diminuída proporção de prostaglandinas	O exercício vigoroso pode aumentar PGF, que reduz a proliferação celular relativa ao cólon, enquanto não aumenta a prostaglandina E2 (PGE2) que apresenta efeito oposto.
	Secreção do ácido biliar diminuída ou metabolismo do ácido aumentado	As concentrações do ácido biliar podem ser diminuídas em pessoas ativas fisicamente.
Mama	Diminuição à exposição ao estrogênio	A atividade física atrasa a menarca, reduz o número de ciclos ovarianos e reduz a produção de estrogênio ovariano. Também reduz a gordura corporal e pode reduzir os estrógenos produzidos por ela. Aumenta a produção de globulina ligada ao hormônio sexual, resultando em menos estrogênio disponível biologicamente.
Próstata	Reduzida exposição à testosterona	A atividade física aumenta a produção de globulina transportadora de hormônio sexual, resultando em baixa concentração de testosterona livre.
Todos os cânceres	Predisposição genética	Fatores constitucionais influenciam a seleção atlética ou interesse na atividade física e suscetibilidade ao câncer.
	Aumento induzido pelo tumor nas defesas imunológicas anti-tumorais	O exercício pode aumentar o número e atividade de macrófagos, células NK ativadas por linfocinas e sua regulação de citocinas, podem aumentar a proliferação linfocitária induzida por mitógeno
	Melhores sistemas de defesa antioxidantes	O exercício vigoroso aumenta a produção de radicais livres, enquanto o exercício crônico melhora as defesas contra radicais livres e níveis antioxidantes
	Diminuição nas concentrações circulantes de insulina e glicose	A extensão das mudanças induzidas pelo exercício na defesa oxidante é desconhecida
	Diminuição da insulina e fatores de crescimento insulin-like (IGFs)	O exercício pode aumentar a concentração de insulina e IGF-1 biodisponíveis, os quais aumentam a divisão das células normais e inibem a morte celular.

A prática do exercício físico induz à diversas adaptações bioquímicas nos tecidos muscular e hepático, facilitando a mobilização e oxidação dos

triacilgliceróis e a remoção de lactato produzido durante a realização do esforço físico. O treinamento físico também causa outras adaptações positivas como o aumento das reservas energéticas em diferentes órgãos e tecidos, contribuindo para a capacidade do organismo manter o trabalho muscular por mais tempo através de mecanismos de supercompensação (NAKATAMI, et.al., 1997; HICKNER et. al., 1997; MURAKAMI et.al. 1997).

Mecanismos potenciais influenciados pelo exercício incluem alterações nos hormônios esteróides ou insulina e fatores de crescimento *insulin-like*, modulação imunitária, alteração na geração de radicais livres, mudanças na composição corporal ou massa corpórea, e efeitos diretos sobre o tumor (WESTERLIND, 2003).

LEE (2003) revisou estudos epidemiológicos sobre atividade física e o risco de desenvolvimento do câncer e demonstrou que homens e mulheres, ativos fisicamente, têm redução de 30% a 40% no risco do desenvolvimento do câncer de colón, quando comparados com pessoas inativas. Com relação ao câncer de mama, há evidências razoavelmente claras que mulheres fisicamente ativas têm cerca de 20-30% de redução no risco, quando comparadas a mulheres fisicamente inativas. Parece que 30 a 60 minutos diários de atividade física de intensidade moderada a vigorosa são necessários para reduzir o risco desses dois tipos de câncer.

Estudos observaram associações inversas entre atividade física e risco de câncer de mama. A quantidade específica de atividade física necessária para promover uma redução no risco de desenvolvimento do câncer não é totalmente compreendida, mas alguns estudos prévios sugerem que 3-4 ou mais horas por semana podem ser necessárias para promover tal efeito (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

Cerca de 20-70% dos pacientes com câncer apresentam a síndrome da caquexia (TISDALE, 2004). Estes experimentam fadiga e fraqueza em aproximadamente 70% dos casos (DIMEO; RUMBERGER; KEUL, 1998), que vem acompanhada da perda de tecido muscular, sendo este fator contribuinte para a morbidade e mortalidade no câncer (TISDALE, 2004; AL-MAJID; MCCARTHY, 2001). A atividade física pode induzir mudanças tanto na via de síntese quanto na de degradação protéica, sendo que anormalidades em ambas as vias têm sido relacionadas à perda de tecido muscular em indivíduos

com câncer (AL-MAJID; McCARTHY, 2001). Estudos em modelos animais demonstraram que o exercício físico pode prolongar a vida dos indivíduos treinados e diminuir a taxa de crescimento tumoral (BACURAU et al., 2000).

Diversas mudanças metabólicas e hormonais observadas durante a caquexia podem ser contrabalançadas pelo exercício regular, que é conhecido por promover alterações no perfil hormonal de atletas que podem ser sustentadas por mais de 24 horas, e também modular positivamente a resposta imunitária (COSTA ROSA, 2004). O exercício físico induz a transcrição de genes envolvidos no crescimento, vascularização e metabolismo e estas ações indicam uma gama de mudanças na regulação transcricional, as quais têm papel importante nas respostas de adaptação e mudanças metabólicas musculares (ZAMBON et al., 2003).

PETERSEN e PEDERSEN (2005) esclarecem melhor a relação da prática de exercício físico regular e sua ação antiinflamatória. Este estudo evidenciou que o aumento das citocinas antiinflamatórias com a prática de exercício físico está relacionado com a liberação de interleucina-6 (IL-6), a qual, além de induzir a lipólise, a oxidação de ácidos graxos e estar envolvida na homeostase glicêmica durante o exercício, ainda estimula a produção da IL-1ra e IL-10, interleucinas antiinflamatórias que inibem a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α , IL-1 β e TNF- α .

Existe um crescente corpo de evidências indicando os benefícios potenciais do exercício físico para melhoria da qualidade de vida de pacientes com câncer (SMITH, 1996; COURNEYA; FRIEDENREICH, 1999; COURNEYA et al. 2000; COURNEYA 2001; COURNEYA, 2004). Programas de exercícios bem estruturados podem aumentar a saúde relacionada à qualidade de vida em homens com câncer de próstata (SEGAL et al. 2003). Evidências epidemiológicas mostram que níveis moderados ou altos de atividades físicas praticadas no lazer protegem contra câncer de pulmão em homens e mulheres (TARDON, et al., 2005). Weert et. al. (2005) demonstraram que um programa de reabilitação multidimensional de 15 semanas para sobreviventes de câncer, que incluem exercício físico, resultou em efeitos benéficos relevantes sobre a qualidade de vida relacionada à saúde, capacidade de exercício e força muscular em pacientes com diferentes diagnósticos de câncer.

Diversas pesquisas têm demonstrado que pacientes participando de programas de exercício físico mantém alto nível de função física e sofrem menos com estresse psicológico, fadiga e outros sintomas relacionados ao tratamento quando comparados a pacientes sedentários, durante quimioterapia ou radioterapia (WINNINGHAM & MACVICAR 1988; MACVICAR et al. 1989; DIMEO et al. 1998; SEGAL et al. 2003).

O exercício físico pode ser benéfico no tratamento do câncer através da melhoria no humor e na qualidade de vida. Tem sido sugerido um efeito benéfico do treinamento de *endurance* em relação a doença do câncer através da melhoria da imunidade inata. A intensidade, duração, frequência e tipo de exercícios necessitam de esclarecimentos, assim como o início do exercício em relação a carcinogênese ou exposição ao tumor e o estágio de desenvolvimento tumoral (SAEZ, et.al. 2006).

1.3.1 Exercício aeróbico e câncer

Quase que a totalidade dos trabalhos envolvendo exercício físico e indivíduos com câncer foram realizados utilizando-se protocolos de exercício aeróbico com intensidade baixa a moderada. Este tipo de exercício é definido como atividade muscular com alto número de repetições, proferidas por longos períodos, contra uma sobrecarga relativamente baixa (AL-MAJID; McCARTHY, 2001a), como a natação e a caminhada ou corrida em esteira.

O exercício aeróbico tem a capacidade de aumentar a resistência muscular à fadiga, em indivíduos saudáveis, devido às adaptações musculares advindas deste tipo de estímulo. Dentre as adaptações estão o aumento do número de vasos sanguíneos musculares, de mitocôndrias e da atividade das enzimas mitocondriais, o que acarreta em melhoria da capacidade oxidativa muscular (HOLLOSZY; COYLE, 1984; SPINA et al., 1996). Não se pode afirmar que os mecanismos responsáveis pela diminuição da sensação de fadiga, em pacientes com câncer praticantes de exercício aeróbico, são frutos das mesmas modificações no metabolismo muscular, mas algumas evidências sugerem que isto seja verdadeiro (AL-MAJID; McCARTHY, 2001).

O exercício físico não exaustivo causa incremento na produção da enzima superóxido dismutase que age como sinalizadora causando adaptações celulares e regulando as enzimas antioxidantes (GOMEZ-CABRERA et al., 2006).

O exercício aeróbico em intensidade e duração suficientes pode resultar em aumento da geração de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (RONS). A produção de RONS em quantidades que ultrapassem o sistema de defesa antioxidante endógeno pode ser referida como um estresse oxidativo. Biomarcadores de estresse oxidativo têm sido encontrados após a prática de uma série de exercícios físicos. A maioria dos estudos sugerem aumento transitório na oxidação de macromoléculas após o exercício aeróbico, frequentemente às custas do sistema de defesa antioxidante. O treinamento aeróbico pode resultar em supressão (não-eliminação) na oxidação de macromoléculas após sessão aguda de exercício físico, devido ao aumento das defesas antioxidantes e/ou reduzida produção de oxidantes após a sessão de exercício físico agudo (BLOOMER et al., 2006).

Outros estudos também evidenciaram efeitos benéficos do exercício em animais portadores de tumor. WESTERLIND et al. (2003), reportaram retardo no crescimento tumoral em ratos que faziam 30 minutos de natação, 5 dias por semana, durante 8 semanas. LEUNG et al. (2004), demonstraram que o exercício diminuiu em 27% o crescimento do tumor em pacientes com câncer de próstata e esta redução estava relacionada ao aumento da proteína p53 nas células tumorais destes pacientes.

ZIELINSKI et al. (2004) demonstraram que o exercício físico pode influenciar o crescimento tumoral, resultando em regressão e atraso no crescimento. A progressão ou regressão do processo neoplásico é regulada por múltiplos fatores como reações inflamatórias, fatores angiogênicos, citocinas e hormônios (BRIGATI, 2002).

1.3.2 Exercício físico de força e câncer

É sabido que o treinamento com exercício de força aumenta a massa muscular de seus praticantes (PEREIRA, B.; SOUZA, T. P., 2004). Este fato levou alguns pesquisadores a utilizar protocolos envolvendo esse tipo de atividade em indivíduos apresentando alto índice de perda de tecido muscular.

FERRANDO et al. (1997) utilizaram, em seu estudo, protocolo de treinamento de força, por período de duas semanas, em indivíduos jovens,

sadios, que deveriam ficar acamados durante o tempo de realização do experimento. Após as duas semanas, foi mensurada a síntese protéica no músculo vasto lateral da coxa nos grupos treinados e não treinados. O grupo que praticou o exercício de força, enquanto estava acamado, apresentou síntese protéica 42% maior que o grupo não treinado. Em indivíduos portadores de HIV, oito semanas de treinamento de força promoveram ganhos de massa muscular, sendo os indivíduos com o mais alto grau de perda de massa magra os maiores beneficiados, atingindo ganho de 4 kg ao final das oito semanas (ROUBENOFF et. al., 1999).

SEGAL et. al. (2003) relataram que atividade física de resistência em homens com câncer de próstata durante 12 semanas e que faziam tratamento para doença, foi suficiente para melhorar a qualidade de vida e diminuir a fadiga desses pacientes, melhorando também a aptidão muscular.

A literatura científica relacionada à utilização do treinamento de força para prevenir a perda de massa muscular em indivíduos com câncer é bastante pobre. Com base na mesma literatura ainda não é possível afirmar que o treinamento de força reduz a percepção de fadiga ou possui efeitos anabólicos significativos em músculos de indivíduos com câncer (AL-MAJID; MCCARTHY, 2001a).

NUNES (2005) mostrou que ratos portadores do tumor de Walker 256, quando submetidos ao protocolo de treinamento de saltos, durante oito semanas, apresentaram redução do crescimento tumoral *in vivo* e da taxa de proliferação das células tumoral *ex vivo*. As cargas e volumes de exercício utilizadas nesse estudo promoveram efeitos imunopromotores nos indivíduos sem tumor. O protocolo de exercício utilizado foi de saltos com sobrecarga em piscina, caracterizado como exercício resistido.

1.4 Mecanismos de atuação do exercício físico no câncer

Existem múltiplos fatores atuando na relação do exercício físico com o câncer. Um destes mecanismos envolve a peroxidação lipídica nas células tumorais frente ao exercício físico. A peroxidação lipídica começa pela extração de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos ricos em insaturações para formar um radical de ácido graxo. Isto pode ser iniciado pelos radicais livres. A

geração de radicais de lipoperóxidos produz moléculas que são capazes de reagirem com outros ácidos graxos insaturados e desse modo, iniciar nova reação, formando hidroperóxidos lipídicos e um novo radical de ácido graxo para posterior peroxidação. Os produtos de peroxidação gerados dessa maneira danificam a membrana celular e o DNA resultando em efeitos citotóxicos nas células cancerígenas (CLARKSON; THOMPSON, 2000).

Os produtos da peroxidação lipídica podem causar alterações na membrana e estrutura das células, alterações do citoesqueleto, levando a célula a entrar em apoptose (ZANETTI, R. et al, 2000).

Tem sido mostrado que o exercício físico é um forte indutor da peroxidação lipídica. Muitos estudos têm mostrado que a peroxidação lipídica e a produção de radicais livres estão aumentadas em humanos e animais após atividade física (KOSTKA et.al, 1998). O exercício físico induz ao aumento de até 20 vezes no volume de oxigênio total consumido (VO_2). Cerca de 2 a 5 % do oxigênio que entra na cadeia respiratória dá origem a espécies reativas de oxigênio (EROs). A alta peroxidação pelas EROs é responsável por várias ações deletérias, como o aumento na taxa de peroxidação lipídica de membranas e danos no DNA, podendo inclusive causar morte celular (ZOPPI, 2003; CLARKSON, 2000). A literatura sugere que *in vivo* e *in vitro* existe poderosa e consistente influência do exercício físico na proteção contra o câncer de mama relacionada com a geração de produtos da peroxidação lipídica (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

É interessante notar que ambos, o efeito protetor do exercício no câncer de mama e a geração de radicais livres, que ocorre após o exercício de moderado a exaustivo, sustentam a hipótese de que a peroxidação lipídica é um mecanismo potencialmente importante da relação entre exercício físico e câncer de mama. A peroxidação lipídica parece aumentar após os exercícios físicos de *endurance* e de resistência.

O exercício físico envolve o aumento de 10 a 20 vezes do consumo total de oxigênio pelo corpo e aumento de 100 a 200 vezes no consumo local de oxigênio pelos músculos (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

Uma correlação positiva entre a contagem de neutrófilos e a concentração de marcadores de peroxidação lipídica após o exercício de resistência em homens foi recentemente reportada. É bem estabelecido que os

neutrófilos possam gerar espécies reativas de oxigênio através de um processo oxidativo, que pode ser aumentado pelo exercício induzindo a danificação e contribuindo para a peroxidação lipídica (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

São limitados os dados experimentais do exercício físico e peroxidação lipídica no câncer. Em recente experimento GAGO-DOMIGUEZ, et.al., (2006) usaram ratos e os distribuíram em três grupos: a) controle, b) treinados mas com o exercício interrompido no ponto de inoculação das células tumorais, c) treinados com inoculação das células e o exercício continuando durante todo o experimento. O tamanho do tumor dos animais exercitados continuamente foi significativamente menor que o grupo controle e exercitado com interrupção. O grau de peroxidação lipídica tendeu a ser maior nos tumores menores e diminuiu nos tumores maiores. O grau aumentado de peroxidação lipídica nos tumores menores não parece ser paradoxal, pois estes podem inibir a proliferação das células tumorais. Em adição, tumores menores estariam associados com maiores quantidades de I- κ B, indicando uma diferença na via de sinalização “redox” e ligação entre a sinalização redox e o desenvolvimento tumoral (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

Está bem estabelecido e aceito que peróxidos e superóxidos gerados durante o processo de peroxidação lipídica promovem dano ao DNA e a outras funções celulares em condições patológicas. Em adição, foi também mostrado que algumas células tumorais são mais resistentes à peroxidação lipídica (DORMANDY, 1983; CHEESEMAN et al, 1984). A principal razão para esta resistência é, provavelmente, a deficiência da delta-6 desaturase nas células tumorais, o que acarreta em menor síntese de lipídios insaturados nas células tumorais e posterior incorporação em suas membranas. Assim, as células tumorais têm ausência de substrato para peroxidar (HORROBIN, 1990).

HORROBIN (1981) demonstrou que contornando esta deficiência, ou seja, fornecendo às células tumorais ácidos graxos ricos em insaturações resultou em excessiva produção de superóxidos e morte das células tumorais. Inibidores da COX não tiveram sucesso em bloquear tal ação, mas antioxidantes e a superóxido dismutase minimizaram tais efeitos (BEGIN e HORROBIN, 1985; BEGIN et al, 1988; DAS et al, 1987)

MUND, R. C. et.al (2007) encontraram resultados em ratos que, quando suplementados com óleo de peixe rico em ômega 3, tiveram aumento da

apoptose e da peroxidação lipídica no tecido tumoral, com redução na proliferação das células tumorais *ex vivo*, menor expressão da COX-2 e da produção da prostagladina E₂.

Quanto à influência do exercício físico na peroxidação lipídica, em resumo, pode-se dizer que o exercício induz aumento no consumo de oxigênio bem como na demanda energética. Este aumento no consumo de oxigênio tem como consequência o incremento na produção de EROs. Dependendo de sua concentração as EROs oxidam estruturas celulares, sendo que altos níveis dessa oxidação prejudicam a homeostase intracelular. Por outro lado, o treinamento também age modulando os sistemas antioxidantes intracelulares, aumentando a capacidade de remover EROs através das enzimas antioxidantes glutathione redutase e catalase. (PEREIRA, B.; SOUZA, T. P., 2004)

Estudo com jogadores de futebol, acompanhados por cinco meses, mostraram que as enzimas antioxidantes foram eficientes em tamponar o possível aumento de EROs induzido pelos jogos, impedindo a ocorrência de lesões musculares de origem oxidativa ao longo do campeonato (ZOPPI, C. C., 2003). As enzimas antioxidantes possuem a capacidade de se adequarem ao aumento na produção de EROs através do aumento na sua atividade (YU, 1994). O aumento na atividade das enzimas antioxidantes, no músculo e sangue, é induzido pelo treinamento físico, sendo a atividade dessas enzimas moduladas pela própria concentração de EROs (JI, 2002).

O exercício físico pode ainda gerar radicais livres por outras vias, incluindo: a) o aumento da epinefrina e outras catecolaminas que podem produzir radicais livres quando são metabolicamente inativadas; b) produção de ácido láctico, que pode converter superóxido em hidroxila e c) respostas inflamatórias por dano muscular causado pelo esforço (CLARKSON, et. al, 2000).

O exercício físico pode estar relacionado a peroxidação lipídica e a taxa de apoptose das células tumorais considerando que aumenta a produção de radicais livres, porém parece que o treinamento tem a propriedade de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes. Ainda, existe uma heterogeneidade elevada nos diversos estudos envolvendo exercício físico e peroxidação lipídica, devido aos tipos de treinamentos, intensidades e grupos envolvidos,

não permitindo afirmar que o treinamento aeróbico diminui o efeito pró-oxidante do exercício físico intenso, e sim que existe tendência do treinamento moderado em propiciar queda na peroxidação lipídica tecidual (PEREIRA; SOUZA, 2004).

Existem dois tipos morfollogicamente distintos de morte celular. Na apoptose há ausência de informação e lisossomos intactos. As mudanças morfológicas durante a apoptose foram identificadas e incluem a condensação de cromatina, encolhimento citoplasmático e fagocitose dos fragmentos citoplasmáticos pelos macrófagos e outras células com capacidade fagocitária. A apoptose, tipicamente, não induz a morte das células vizinhas, inflamação ou cicatrização tecidual, desempenhando seu papel na renovação celular normal durante a embriogênese e em tecidos adultos. Dependendo do estímulo apoptótico e do tipo de células afetadas, este processo pode demorar algumas horas ou dias. Na maioria das células somáticas ou tumorais, a apoptose ocorre por duas vias de sinalização distintas. A via extrínseca, envolvendo a ativação dos receptores para morte celular e receptores para o fator de necrose tumoral; a via intrínseca, envolvendo a ativação de algumas pró-caspases e a liberação mitocondrial de fatores apoptóticos com o citocromo C e o fator indutor de apoptose dentro do citoplasma. Subseqüentemente, uma cascata de eventos direcionados, primeiramente, pela ativação das caspases proteolíticas, resultando em processo de estruturação intracelular das proteínas e regulatório de enzimas que culminam com a morte celular por apoptose (ZHANG; et.al., 2004).

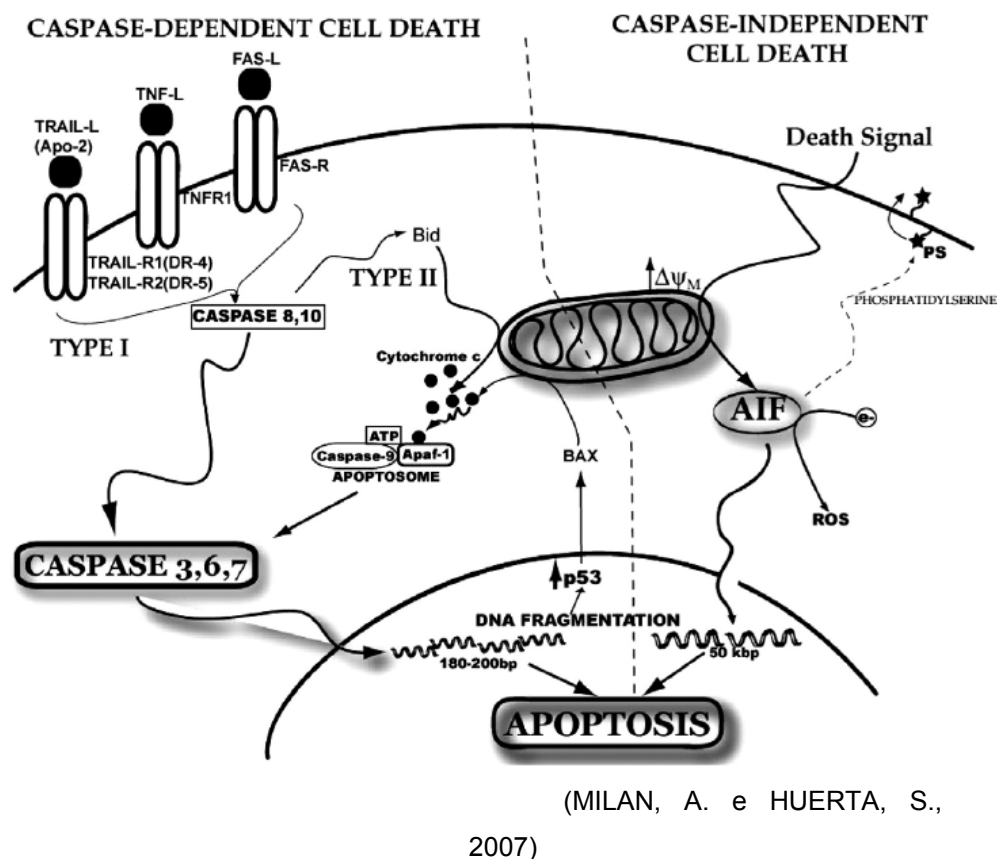


FIGURA 1. Mecanismos indutores de apoptose

A apoptose é reconhecida como importante processo em diferentes sistemas biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, renovação de células e a resposta imunitária contra as células tumorais ou infectadas por vírus. Tanto sob condições fisiológicas ou patológicas, a apoptose é, em sua maioria, direcionada pela interação de algumas famílias de proteínas, isto é, caspases, proteínas Bcl-2 e proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (ZHANG; et.al., 2004).

1.4.1 O papel do estresse oxidativo do exercício como indutor da apoptose

Tem sido demonstrado que a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio durante o exercício leva ao aumento da apoptose das células (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006). Existem evidências que a apoptose induzida pelo exercício ocorre em linfócitos e no músculo esquelético. Estudos prévios

têm mostrado que a contagem de linfócitos e suas funções são diminuídas, em resposta ao exercício exaustivo (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

A externalização da fosfatidilserina, em linfócitos, é marcador de apoptose e ocorre pós-exercício exaustivo (80% VO₂max), mas não ao exercício moderado (60% VO₂max), em humanos.

Também no tecido muscular há diminuição na expressão da Bcl-2 (promotora da sobrevivência celular) imediatamente após o exercício e aumento na expressão de Bax (promotora da apoptose) 96 horas após o exercício (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006).

O exercício físico pode aumentar o estresse oxidativo e subsequente apoptose das células malignas e pré-malignas do câncer de mama, protegendo assim contra a doença. Não existem dados de estresse oxidativo induzido pelo exercício físico em estudos com animais ou humanos com câncer e mama.

As células têm forte sistema de defesa antioxidante endógeno contra o aumento da peroxidação lipídica e espécies reativas de oxigênio, através das enzimas anti-oxidantes como a glutathione peroxidase (GPX) e a catalase (CAT). O efeito do exercício físico nas enzimas anti-oxidantes no fígado e músculo esquelético, e mudanças nessas enzimas são também respostas fisiológicas ao estresse oxidativo induzido pelo exercício físico.

Alguns estudos têm mostrado aumento significativo na atividade de enzimas antioxidantes hepáticas subsequente ao treinamento de exercício de *endurance* (GAGO-DOMIGUEZ, et.al., 2006). EROs, principalmente H₂O₂ podem estimular a expressão de genes de enzimas anti-oxidantes, proteínas imuno-ativas como citocinas e quimiocinas, e fatores de transcrição. A principal via é a do NFκB, MAPK (mitogen-activated protein-kinase), PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/Akt e ativação da p53 (JI, L.L., 2007)

A relevância do presente estudo encontra-se no grande aumento do número de casos de câncer, sendo que mais de 11 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer a cada ano (OMS, 2005). Dentro dessa perspectiva, o exercício físico tem sido mostrado atuar de forma positiva nesse quadro, melhorando o sistema imunitário, atuando diretamente no controle da proliferação de células tumorais, impedindo a perda de massa muscular, competindo com o tumor por nutrientes e ainda modulando mecanismos hormonais e vias inflamatórias.

De acordo com o relatório sobre Saúde no Mundo (OMS, 2002), baixos níveis de atividade física causam 1,9 milhões de óbitos por ano no mundo. Globalmente, estima-se que a falta de exercícios seja a responsável por 10% dos casos de câncer de cólon. A atividade física é considerada fundamental para a prevenção de doenças crônicas, porém 60% da população mundial não obedece a recomendação mínima de 30 minutos diários de atividade física de intensidade moderada.

Existem três hipóteses mais prováveis sobre o efeito do exercício em atuar na redução da caquexia e do crescimento tumoral, aumentando a sobrevida dos portadores da doença. A primeira hipótese é da atuação sobre o sistema imunitário e através deste melhorar o quadro da doença, a segunda hipótese é de atuação direta sobre a massa tumoral. A terceira hipótese é de que haja uma combinação de todos os fatores relacionados as duas hipóteses anteriores. Neste estudo investigamos alguns mecanismos de atuação do exercício dentro da segunda hipótese.

O estudo dos efeitos do exercício físico através de modelos experimentais com animais de laboratório permite investigação mais profunda sobre a ação da atividade no organismo exercitado, possibilitando novas descobertas, formas de combate a doenças e entendimento dos mecanismos pelos qual o exercício físico pode estar atuando.

2. OBJETIVO

Há vários relatos de diferentes vias serem ativadas para promoverem a morte, regressão ou retardo no crescimento tumoral. Assim, neste trabalho investigaremos os efeitos anti-caquéticos e anti-tumorais do exercício anaeróbio e aeróbio e a participação de proteínas envolvidas na morte celular em indivíduos portadores de tumor de Walker 256 exercitados.

2.1 Objetivo Geral

Investigar parâmetros de caquexia e crescimento tumoral em ratos Wistar portadores do tumor de Walker 256 que realizam exercício físico anaeróbio e aeróbio e investigar alguns dos mecanismos intracelulares que participam neste processo.

2.2 Objetivo específico

Para alcançar estes objetivos as seguintes variáveis foram analisadas:

- Peso do rato
- Peso do tumor
- Lactatemia plasmática
- Triacilglicerolemia plasmática
- Proliferação *ex-vivo* das células tumorais
- Percentual de apoptose e necrose das células tumorais
- Lipoperoxidação em tecido tumoral
- Expressão de PIF, Bcl-2 e Bax em tecido tumoral.

3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS

Este estudo teve característica experimental com variáveis independentes e dependentes bem definidas, buscando uma relação causa-efeito entre elas.

3.1 Amostra

Foram utilizados ratos machos albinos adultos (70 dias) da linhagem Wistar, mantidos em ciclo claro/escuro (22/10 horas) e temperatura constante ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) com livre acesso a comida e água. Os animais foram obtidos no Biotério do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, UFPR – Campus do Centro Politécnico, Curitiba – Paraná.

3.2 Desenho do estudo

Os ratos foram separados em seis grupos de maneira não-probabilística e com seleção intencional, de forma que todos os grupos tivessem as mesmas características iniciais. A seleção intencional considerou que a média de massa corporal dos ratos deveria ser similar nos grupos. Foram realizadas quatro repetições do protocolo experimental, sendo que em cada repetição os grupos tinham 5 ratos. Considerou-se que existia a possibilidade de mortalidade dos ratos durante o período de aplicação dos procedimentos, assim como mortalidade experimental de dados.

Os seis grupos foram:

- 1 Sedentários
- 2 Treinados com exercício de salto
3. Treinados com exercício de natação
4. Sedentários e portadores do tumor de Walker 256 (Sedentário W)
5. Treinados com exercício de salto e portadores do tumor de Walker 256 (Salto W)
6. Treinados com exercício de natação e portadores do tumor de Walker 256 (Natação W)

3.3 Instrumentos e procedimentos

3.3.1 Protocolos de treinamento

Protocolo de exercício de salto:

Realizou-se um período de adaptação ao meio líquido (30 minutos de natação por dia durante 2 dias, sem utilização de carga). Após esse período, os animais dos grupos de exercício de força realizaram um programa que se constitui de saltos em tanque com água, com sobrecarga equivalente à 50% da massa corporal de cada animal (atualizados semanalmente), acoplada ao tórax. As sessões de treinamento foram compostas de 10 séries, com duração de 30 segundos e com intervalo de 1 minuto entre cada série. Foram feitas 4 sessões semanais de treinamento, com descanso nas quartas-feira e fins de semana, durante o período de 8 semanas. A temperatura da água foi mantida entre 30°C e 32°C. Os saltos foram realizados em tubo de PVC com 250 mm de diâmetro, visando limitar a alternativa do animal em seguir para outra direção, favorecendo, dessa forma, o exercício de salto. A profundidade da água foi correspondente a 150% do comprimento corporal do rato (NUNES, E. 2005; MINIZZI, L.G., 2006).

TABELA 2. Protocolo de treinamento de salto.

SEMANA	DIAS DA SEMANA			
	Segunda feira	Terça feira	Quinta feira	Sexta feira
Adaptação	-	-	30min / 0%	30min / 0%
1ª.	10 x 30s. / 30%	10 x 30s. / 30%	10 x 30s. / 30%	10 x 30s. / 30%
2ª.	10 x 30s. / 40%	10 x 30s. / 40%	10 x 30s. / 40%	10 x 30s. / 40%
3ª.	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%
4ª.	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%

5ª.	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%
6ª.	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%
7ª.	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%
8ª.	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%	10 x 30s. / 50%

LEGENDA: Número de séries x tempo de cada série / sobrecarga utilizada

O intervalo entre cada série foi de 1 minuto.

Protocolo de exercício de natação

Foi realizado um período de adaptação ao meio líquido (30 minutos de natação por dia durante 2 dias, sem utilização de carga). Após esse período, os ratos fizeram 1 hora de natação, com intervalo de 5 minutos após os primeiros 30 minutos, com sobrecarga de 6% do peso corporal de cada animal (atualizados semanalmente) acoplado ao tórax (BRITO, 2006). Sobre pesos de 6-8% do peso corporal do animal são considerados cargas aeróbicas e apresentam *steady-state* de lactato, cargas de 10% são elevadas, mas inferiores ao VO_2 max. e cargas de 12% do peso corporal de ratos evidenciam o VO_2 máx. Cargas supra-máximas são produzidas por sobre pesos de 15% do peso corporal do animal (KOKUBUN, 1990). A sobrecarga de até 6% do peso corporal é máximo peso considerado como carga aeróbia (GOBATO et al., 2001 ; ROMBALDI, 1996). O período total de treinamento, necessário para produzir as adaptações requeridas é de 6 semanas (GOBATO et al., 2001).

TABELA 3. Protocolo de treinamento de natação

SEMANA	DIAS DA SEMANA			
	Segunda feira	Terça feira	Quinta feira	Sexta feira
Adaptação	-	-	30 min / 0%	30min / 0%
1ª.	60min / 4%	60min / 4%	60min / 4%	60min / 4%
2ª.	60 min / 5%	60 min / 5%	60 min / 5%	60 min / 5%

3^a.	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%
4^a.	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%
5^a.	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%
6^a.	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%
7^a.	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%
8^a.	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%	60 min / 6%

LEGENDA: Tempo de natação / sobrecarga utilizada

O tempo de 60 minutos é subdividido em 30 minutos de exercício + 5 de intervalo + 30 minutos de exercício.

3.3.2 Procedimentos para as análises

Determinação do peso corporal:

Durante o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias, no período da manhã, sempre antes do treinamento, utilizando-se a balança Urano modelo UDI 10000/1.

Mensuração do lactato após a sessão de exercício

Imediatamente após o término da sessão de treinamento, um rato de cada grupo foi usado para mensuração da concentração de lactato do sangue retirado da cauda dos animais. A concentração de lactato foi medida através do equipamento AccuSport portátil e fitas de coleta marca BM-Lactate da Roche Diagnostica Brasil Ltda.

Implantação do tumor

Nos experimentos foram utilizadas matrizes com o tumor de Walker 256, tipo B, mantido pelo Laboratório de Metabolismo Celular da UFPR. Foi injetado intraperitonealmente em um rato macho adulto suspensão de 1 mL contendo 2×10^7 células/mL do tumor de Walker 256 tipo B. Após um período de aproximadamente cinco dias, quando constatado a ascite, o animal foi ortotansiado e injetado 10 mL de solução salina 0,9% em sua cavidade abdominal. Em seguida, massageou-se seu abdome, e através de laparotomia mediana, foi coletado, da cavidade abdominal, com pipeta de plástico, o fluido contendo as células tumorais. Foi feita a contagem do número de células tumorais utilizando-se câmara de Neubauer. Após a contagem, 3×10^7 células (em 1 mL de solução) foram inoculadas por injeção sub-cutânea no flanco direito nos animais em experimentação por volta da sexta semana de treinamento.

Ortotanásia dos indivíduos:

Após 8 semanas de treinamento, coincidindo com o 14º dia após a implantação do tumor, foi realizada a ortotanásia dos indivíduos com o auxílio de guilhotina. Este método foi utilizado para facilitar a retirada de grande

volume de sangue, necessário às análises séricas. Adicionalmente, foi retirado a massa sólida tumoral.

Determinação da massa tumoral

Após a ortotanásia o tumor foi retirado e pesado em balança (Denver Instrument XL-410) previamente aferida.

Determinação dos Triacilgliceróis (TAGs)

O procedimento foi realizado pelo método enzimático colorimétrico, que utiliza quatro enzimas, conforme o sistema comercial TRIGLICÉRIDES GPO-ANA da Labtest. As amostras foram preparadas seguindo-se as instruções do fabricante, e após a leitura da absorbância em 540nm, a concentração de triacilgliceróis foi expressa em mg/dL.

Mensuração do Lactato plasmático

O lactato sanguíneo foi determinado pelo método enzimático, segundo ENGLE & JONES (1978). Inicialmente, fez-se a desproteinização do soro, pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA a 25%) a 0,5 mL da amostra e a mistura foi agitada em vórtex, centrifugada por 1 minuto a 13.000 rpm em centrífuga Eppendorf modelo 5810R. Em seguida, foram coletados 200 mL do sobrenadante e adicionou-se 2 µL de indicador universal para permitir a visualização da neutralização do soro, pela adição de KOH/TRIS (0,5 M/2 M), sinalizada pela coloração verde, indicando pH 7,0. Deste volume neutralizado pipetou-se 100 mL em tubos de ensaio contendo 1 mL do tampão TCA e, após 45 minutos, fez-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 340nm (Pharmacia 4300 Pro). O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato em piruvato pela ação da lactato desidrogenase, ocorrendo consumo de NAD^+ com formação estequiométrica de NADH, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente, fornecendo as concentrações de lactato existente na amostra.

Proliferação de células tumorais

Após a massa sólida ser retirada e passar por processo de isolamento das células do tumor de Walker 256, estas foram colocadas para cultivo em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 10.000U e estreptomicina 10 mg/L) contendo inicialmente 1×10^5 células por poço, em placas de 96 poços (volume 200 μ L), a 37° C em atmosfera de 95% ar / 5% CO₂. (MUND et al, 2007).

Concomitantemente ao plaqueamento das células tumorais, foi adicionado (2¹⁴C)-Timidina (0,02 μ Ci/poço). As células foram cultivadas por um período de 24 horas. A timidina é análoga da base púrica timina e incorporara-se aos novos DNAs formados durante a proliferação. Após este período, as células foram coletadas, automaticamente, em coletor múltiplo (Skatron Combi Multiple Cell Harvester, UK) em papéis filtro nº 11731 (Skatron Combi - UK). Neste método não há necessidade de processos extrativos preparatórios para obtenção de DNA celular. Os discos de papéis contendo a radioatividade incorporada no DNA foram transferidos para frascos contendo 1 mL de líquido de cintilação e levados para contagem da radioatividade em contador Beckman LS 6000.

Peroxidação Lipídica

O método para mensuração da formação de hidroperóxidos lipídicos foi por FOX2 (ferrous oxidation in xilenol orange, version 2) em conjunção com trifetilfosfina proposto por NOUROOZ-ZADEH et.al. (1994). As amostras do tecido tumoral foram homogeneizadas em metanol na proporção 5:1. Após, foram centrifugadas a 5000 G, durante 5 minutos a 4°C, do sobrenadante transferiu-se uma alíquota de 90 μ L para tubos. Em três tubos colocou-se 10 μ L de trifetilfosfina e, em outros 3, adicionou-se 10 μ L de metanol. A mistura foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se a cada tubo 900 μ L do reagente FOX2 (xilenol laranja 100 μ M, hidroxitolueno butilado 400 mM, ácido sulfúrico 25 mM e sulfato ferroso de amônio 250 em metanol 90%) e incubou-se em temperatura ambiente por mais 30 minutos. Os tubos com as amostras foram centrifugados

a 2400 G por 10 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro em comprimento de onda de 560nm. Para a determinação da concentração de hidroperóxidos nas amostras, subtraiu-se o valor da absorbância das amostras tratadas com trifenilfosfina do valor da absorbância das amostras sem a mesma. O valor obtido foi analisado de acordo com a curva padrão de peróxido de hidrogênio, a qual foi obtida com soluções padrão de peróxido de hidrogênio, em diferentes concentrações (100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1 e 1.6 μM) submetidas aos mesmos procedimentos descritos acima para a dosagem de hidroperóxidos (com exceção ao tratamento com TPP). Dividiu-se o valor da concentração de hidroperóxidos (nmol/ml) pela concentração de proteínas (mg/ml), obtendo-se assim o valor de hidroperóxidos por quantidade de proteínas (nmol de hidroperóxidos / mg de proteínas).

Este método quantifica a formação de hidroperóxidos durante a peroxidação lipídica. Baseia-se no princípio de que hidroperóxidos oxidam ferro a íon férrico e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja. de solução de trabalho, contendo: MeOH 90%, 100 μM xilenol laranja (Sigma), 25mM de H_2SO_4 , 4mM de BHT, 250 μM de Fe_2SO_4 .

Determinação da quantificação protéica para peroxidação lipídica

A quantificação de proteína das amostras tumorais foram mensuradas pelo método de Bradford (1976), que utiliza o corante Coomassie Blue G 250 que se liga à proteína resultando em coloração azul, passível de ser detectada em comprimento de onda de 450nm, calculada com base em curva padrão de proteína conhecida. A leitura foi feita em espectrofotômetro ULTROSPEC 2000 (Pharmacia) a 595nm.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O método "SDS-PAGE" foi desenvolvido para que a migração dependa primariamente do tamanho da proteína. O SDS (dodecil sulfato de sódio) é um poderoso detergente carregado negativamente que se liga a regiões

hidrofóbicas das proteínas. O complexo formado SDS-proteína distribui carga negativa semelhante entre todas as proteínas, que migrarão para o pólo positivo do campo elétrico. Portanto, a migração das proteínas no método "SDS-PAGE" depende dos seus pesos moleculares.

Após quantificação protéica das amostras, foi realizada diluição das mesmas utilizando tampão de Laemmli para deixar as amostras em uma concentração de 3 µg/ µL. O tampão de Laemmli constitui-se de SDS para desnaturar a proteína e prover carga negativa constante de forma que todas fiquem com a mesma carga na amostra; glicerol para dar à amostra densidade maior do que o tampão de corrida; e β-mercaptoetanol (agente redutor) para desfazer pontes dissulfeto da estrutura protéica, possibilitando a separação da amostra em subunidades.

O gel de empilhamento foi preparado a 4%, permitindo que todas as proteínas migrem com a mesma velocidade no início da corrida. Chegando ao gel de separação, as proteínas começam a migrar de acordo com seus tamanhos. A concentração de poliacrilamida do gel de separação foi de 15%. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em "SDSPAGE" por cerca de 2 horas (200 V, 400 mA). Esta separação das proteínas é importante para a posterior identificação delas pelo uso de anticorpos (Western Blotting).

“ Western Blotting”:

O método de "Western blotting" surgiu em 1979, descrito por Towbin e colaboradores. Baseia-se na identificação de proteínas específicas pelo uso de anticorpos mono e policlonais, incluindo a detecção, quantidade relativa e o peso molecular das proteínas em uma mistura complexa.

Após a separação das proteínas em SDS-PAGE, estas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi submetida à incubação com tampão de bloqueio, contendo 1,5% de BSA, para bloqueio de ligação não específica do anticorpo, durante duas horas. Após este período, a membrana foi incubada em tampão de incubação contendo 1,5% de BSA e o anticorpo primário para as proteínas alvos (PIF, Bax, Bcl-2).

Após o tempo de incubação, a membrana foi submetida à outra incubação contendo um segundo anticorpo voltado para o primeiro, conjugado

com uma enzima. A enzima utilizada foi a HRP (horseradish peroxidase) ou no caso do PIF utilizou-se anticorpo conjugado com estreptavidina.

Esta enzima permite, pela adição de um substrato cromogênico ou quimioluminescente, a visualização da proteína identificada pelo anticorpo em filme Kodak para radiografia. As bandas foram analisadas por densitometria através do programa “Scion Image”.

Apoptose e necrose das células do Tumor de Walker 256.

A anexina V- FITC é um marcador de apoptose, pois se liga ao fosfolípido fosfatidilserina, externalizado da membrana interna para a membrana externa, durante o início do processo de apoptose. Para determinação da necrose foi utilizado o intercalante de DNA 7-AAD. Foram utilizadas 10^6 células tumorais de cada grupo em duplicata para o procedimento de marcação com Anexina e 7AAD. Após separação das células do tecido tumoral em meio de cultivo, as mesmas foram centrifugadas a 1200 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas em tampão salina fosfato (PBS). O sedimentado foi ressuspensão em tampão de ligação. Colocou-se então 100µL desta solução em tubo de citômetro e adicionou-se 5 µL de anexina V-FITC. As amostras foram agitadas e incubadas por 5 minutos, onde posteriormente foi adicionado 5 µL de 7-AAD e incubou por mais 10 minutos. Adicionou-se 400 µL de tampão de ligação e as amostras foram lidas em citometria de fluxo utilizando-se o canal FL1 as para células marcadas com anexina V e FL3 para às com 7-AAD. Os gráficos foram expressos em percentuais de células em apoptose, necrose, dupla marcação e viáveis.

3.4 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada no Laboratório de Metabolismo Celular do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob orientação do professor Dr. Luiz Cláudio Fernandes. A coleta de amostras de tecidos e sangue foi realizada em quatro ocasiões diferentes, ou seja, no término de cada experimento, coincidindo com 8 semanas de treinamento e 15 dias após a implantação do tumor nos ratos participantes do estudo. Todos os estudos envolvendo animais foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. As

enzimas, reagentes e meio de cultura foram obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, USA.

4. PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), representativo de quatro experimentos diferentes. Os dados foram submetidos a análise de variância de uma via (One-way), seguido de pós-teste de Bonferroni. Quando indicado, utilizou-se o teste t de Student. O valor de $p < 0,05$ foi tomado para indicar nível de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Concentração de lactato imediatamente após os exercícios

Imediatamente após o término das sessões de exercício físico foi realizada a coleta de sangue pela cauda dos animais e mensurou-se a concentração de lactato sérico (figura 2).

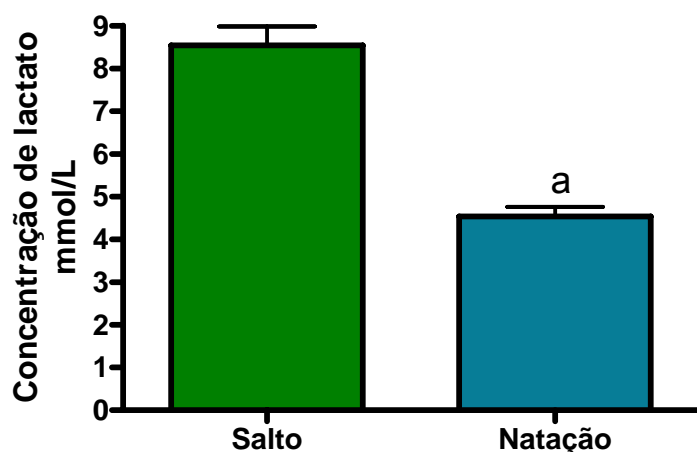


FIGURA 2: Concentração de lactato (mmol/L) após a sessão de exercício de salto ou natação. Os dados representam a média \pm e.p.m de 10 animais por grupo.

a: $p < 0,0001$ vs. salto.

Os ratos do grupo exercitados com o protocolo de salto apresentaram lactatemia de $8,53 \pm 0,44$ mmol/L, demonstrando a predominância anaeróbica do protocolo de salto. Nos ratos exercitados com natação a concentração de lactato, imediatamente após o exercício, foi de $4,53 \pm 0,22$ mmol/L, mostrando a predominância aeróbia do exercício.

Sobrepesos de 6 a 8% do peso corporal do animal são considerados cargas aeróbicas e apresentam *steady-state* de lactato. Cargas de 10% são elevadas, mas inferiores ao VO_2 max. e cargas de 12% do peso corporal de ratos evidenciam o VO_2 max. Cargas supra-máximas são produzidas por sobrepesos de 15% do peso corporal do animal (KOKUBUN, 1990).

Assim, os dois protocolos de exercício utilizados para esta pesquisa têm características diferentes quanto a sua predominância de metabolismo energético bem como pelo aspecto de duração e padrão de movimento. O exercício de saltos tem característica anaeróbica, com alta intensidade e curta duração (10 séries de 30 segundos), já na natação tem característica aeróbica, com intensidade e duração moderada (2 séries de 30 minutos).

5.2 Massa corporal dos ratos

TABELA 4: Massa corporal (g) dos animais no dia em que foram inoculadas as células tumorais e no final do experimento, os valores de ganho de peso, massa tumoral, massa da carcaça (massa corporal – massa tumoral) e o ganho de massa real. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m.

Grupo	Massa corporal (g) no dia da inoculação	Massa corporal (g) final	Ganho de massa corporal (g)	Massa tumoral (g)	Massa (g) da carcaça	Ganho de massa corporal real
Sedentário	369,7 \pm 11,3	378,5 \pm 10,9	9,8 \pm 2	-	378,5 \pm 10,9	9,8 \pm 2
Salto	331 \pm 7,8	339,4 \pm 7,6	6,7 \pm 1,5	-	339,4 \pm 7,6	6,7 \pm 1,5
Natação	332,7 \pm 4,9	340 \pm 4,9	8,9 \pm 1,7	-	340 \pm 4,9	8,9 \pm 1,7
Sedentário W	387,7 \pm 11,7	388,7 \pm 7,3	1 \pm 3,2 a	25,2 \pm 2	363,5 \pm 14	-24,2 \pm 4,6 a
Salto W	336,0 \pm 6,1	344,9 \pm 7,4	8,8 \pm 1,7	11,7 \pm 1,4	328,8 \pm 6,9	-1,42 \pm 2,7 b
Natação W	342,3 \pm 6,0	351,6 \pm 5,3	9,3 \pm 2,1	10,8 \pm 1,4	336,6 \pm 5,4	0,7 \pm 2,3 b

a: diferença significativa quando comparado ao grupo sedentário, sendo $p < 0,001$ para o ganho de massa corporal real e $p < 0,03$ para o ganho de massa corporal ao final de 14 dias.

b: diferença significativa quando comparado ao grupo sedentário W, sendo $p < 0,05$ entre para o grupo salto W e $p < 0,01$ para o grupo natação W.

Todos os animais, ao final de 14 dias, apresentaram incremento da massa corporal onde nos sedentários foi de 9,8 \pm 2 (g), no treinamento de salto

de $6,7 \pm 1,5$ (g) e de natação $8,9 \pm 1,7$ (g). Nos animais sedentários portadores de tumor não houve ganho de massa expressivo ao final dos 14 dias, sendo assim significativamente menor quando comparado ao de animais sem tumor ($p < 0,003$). Os animais portadores de tumor e submetidos ao treinamento de salto tiveram ganho de massa corporal de $8,8 \pm 1,7$ (g) e os de natação $9,3 \pm 2,1$ (g) que foram significativamente maiores que o do sedentário portador de tumor ($p < 0,003$) mas não foi diferente quando comparados aos seus respectivos controles sem tumor ($p > 0,05$). A subtração da massa tumoral da massa corpórea ao final dos 14 dias representa a massa da carcaça. Este resultado (tabela 3) nos permite inferir, de fato, quanto houve de ganho ou perda de massa corpórea. Assim, nos animais sedentários, houve uma redução de $-24,2 \pm 4,6$ (g), nos submetidos ao treinamento de salto de $-1,42 \pm 2,7$ (g) e no de natação ganho de $0,7 \pm 2,3$ (g).

Os indivíduos que desenvolvem a síndrome da caquexia, muito comum nos portados de câncer, têm diminuição do apetite, fraqueza e perda de peso. A caquexia do câncer leva a um balanço nitrogenado negativo, resultado de intensa diminuição do anabolismo e aumento do catabolismo metabólico (SAINI et.al., 2006). Na verdade, a perda de massa corpórea é importante variável e complicador na terapia contra o câncer. O dado isolado na tabela 1 de redução de massa corpórea equivalente a 6,2% reflete a instalação do quadro de caquexia. Por outro lado, o exercício mostrou ser capaz de impedir a perda de massa corporal. A literatura aponta que a síndrome da caquexia associada ao câncer caracteriza-se pela perda de massa corporal, no mínimo de 5% (ARGILÉS, et. al, 2007). Nossos dados mostram que os ratos do grupo sedentário portadores do tumor de Walker 256 estavam com instalação do quadro caquético e que este parâmetro isoladamente não afetou os ratos exercitados. O mecanismo pelo qual o exercício impediu a perda de massa corpórea não é totalmente conhecido, contudo, ao longo da apresentação dos resultados e sua discussão, demonstraremos algumas sugestões.

5.3 Massa tumoral

Após 15 dias da inoculação das células de Walker 256, a massa tumoral teve maior desenvolvimento nos ratos do grupo sedentário quando comparada

a dos ratos dos grupos que realizaram exercício físico. No grupo sedentário (n=13) a massa do tumor foi de 25 ± 2 g. No grupo exercitado com salto (n=12) foi de $11,7 \pm 1,4$ g e no exercitado com natação (n=14) de $10,8 \pm 1,4$ g. Estes dados mostram que tanto o exercício anaeróbico quanto o aeróbico foram eficazes em diminuir a taxa de crescimento tumoral a qual foi aproximadamente 2,5 vezes menor ($p < 0,001$ vs. sedentário).

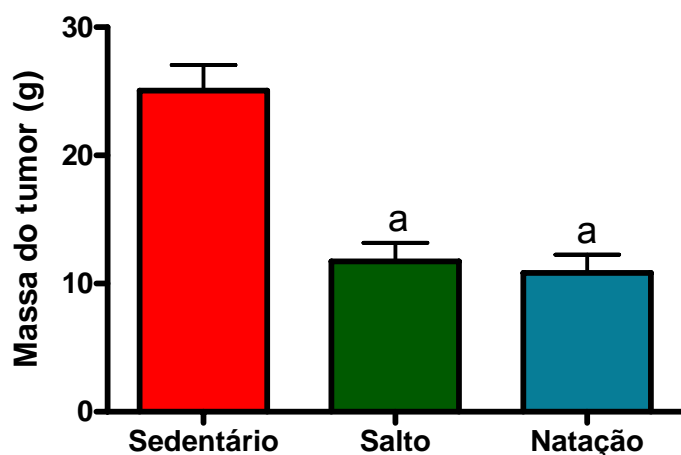


FIGURA 3. Massa tumoral dos ratos dos grupos sedentário, submetidos ao exercício de saltos e exercício de natação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário.

A massa do tumor deve ser considerada como importante fator na análise do quadro de caquexia e proliferação das células tumorais. A caquexia é o resultado de uma variedade de interações entre o hospedeiro e o tumor, porém a completa natureza disto ainda não é totalmente conhecida. O papel do tumor na caquexia inclui a secreção local das citocinas pró-inflamatórias que iniciam a resposta inflamatória sistêmica e a produção de fatores pró-caquéticos que direcionam seus efeitos catabólicos aos tecidos do hospedeiro, a exemplo do PIF e do LMF. A resposta do hospedeiro ao tumor é a indução a anorexia e a alteração na composição corporal, causando perda específica na massa muscular com relativa preservação da massa muscular protéica visceral. (SKIPWORTH, R.J.E., et.al, 2007)

Outros parâmetros de caquexia estabelecidos em ratos portadores de tumor de Walker 256 são os bioquímicos tais como glicemia, lactatemia e triacilglicerolemia (PIZATO, N. et.al, 2005). Animais sem tumor, exercitados ou

não, pós 48 horas do exercício, não apresentaram alteração na concentração sérica de lactato (figura 4) e triacilglicerol (figura 5). Na presença do tumor, tanto o lactato sérico quanto o triacilglicerol elevam-se significativamente quando comparados aos de animais sem tumor ($p < 0,001$). O exercício de salto (anaeróbico) ou de natação (aeróbico) foram hábeis em impedir elevação significativa destes dois parâmetros de caquexia, os quais foram significativamente menores quando comparados aos sedentários com tumor ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Quando comparados aos seus respectivos controles sem tumor estavam em termos absolutos elevados, mas não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$), com exceção do TAGs do grupo natação com tumor que foi diferente do sedentário natação ($p < 0,01$). Estes resultados em conjunto com o de massa corpórea sugerem que o exercício físico aeróbico ou anaeróbico são importantes ferramentas terapêuticas e também de ação preventiva.

5.4 Lactatemia

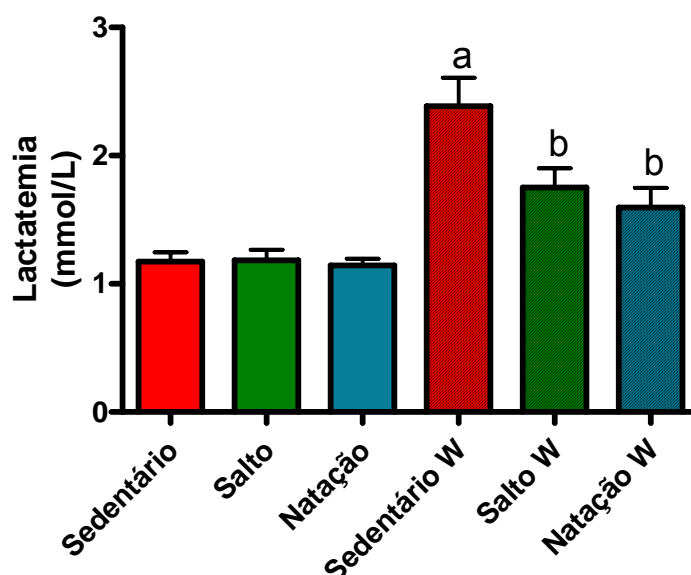


FIGURA 4. Concentrações plasmáticas de lactato (mmol/L) dos ratos dos grupos sedentário, exercício de salto, exercício de natação, sedentários portadores do tumor de Walker 256, exercício de salto e portadores do tumor

de Walker 256, exercício de natação e portadores do tumor de Walker 256 48h após o exercício. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário.

b: $p < 0,05$ Salto W vs. Sedentário W e $p < 0,01$ Natação W vs. Sedentário W.

O aumento do lactato circulante deve-se a elevada atividade glicolítica realizada pelas células do tumor de Walker 256 (DUNLOP; CAMPBELL 2000; TISDALE, 2000; FERNANDES, 1991). O exercício de salto ou natação foram hábeis em reduzir a taxa de crescimento tumoral (figura 4), assim tendo um menor número de células o que levaria a menor taxa de produção de lactato.

Lipídeo é outra importante fonte de energia em situação de insuficiência de nutrientes no organismo, como ocorre em situações fisiológicas como jejum e exercício físico ou patológicas como na síndrome da caquexia. A elevação de triacilglicerol na circulação devido é devido a redução da atividade da enzima lipoproteína lipase, o qual é ativada pela insulina (TISDALE, 2000). Nos animais sedentários portadores de tumor de Walker 256 foram demonstrados apresentarem hipoinsulinemia (FERNANDES, L.C. et.al, 1990). Nosso dado corrobora este último dado e juntamente com a hiperlactatemia demonstram a instalação do quadro caquético.

A figura 5 mostra a concentração de TAGs no plasma dos ratos dos grupos sedentário que foi de $59 \pm 4,8$, salto $54,3 \pm 5,1$, natação $48 \pm 5,1$, sedentário W $104 \pm 8,3$, salto W $8,3$, satação W $82,6 \pm 5,9$. Nos animais com tumor de Walker e sedentários houve elevação da concentração plasmática de TAGs significativa ($p < 0,01$) em relação ao seus controles sem tumor. Os ratos que realizaram os exercícios de salto tiveram concentração de TAGs significativamente menor ($p < 0,05$) que a do grupo sedentário W. Já o grupo natação W apresentou redução na concentração de TAGs de 30% quando comparada à do grupo sedentário W ($p < 0,05$), porém 42% maior que seu controle natação sem tumor ($p < 0,01$).

5.5 Triacilglicerolemia

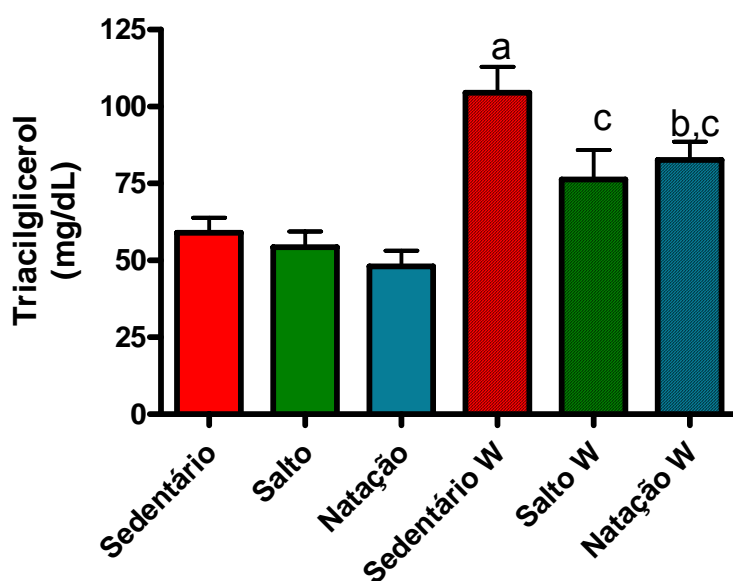


FIGURA 5. Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL) dos grupos sedentário, exercício de salto, exercício de natação, sedentários portadores do tumor de Walker 256, exercício de salto e portadores do tumor de Walker 256, exercício de natação e portadores do tumor de Walker 256 48 horas pós exercício. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário.

b: $p < 0,01$ quando comparado ao grupo natação

c: $p < 0,05$ quando comparado ao grupo sedentário W

A hipertriacilglicerolemia, encontrada nos animais portadores de tumor, é comum durante a caquexia relacionada ao câncer. As anormalidades associadas com a caquexia incluem alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo que o grau de caquexia está inversamente

correlacionado com o tempo de sobrevivência do paciente e implica em complicações no prognóstico (ARGILÉS et. al., 2003). Os pacientes com câncer tem aumento no *turnover* de ácidos graxos e glicerol quando comparados com sujeitos normais, aumentando a concentração de lipoproteínas no plasma (TISDALE, 2001). É importante notar que os ratos portadores do tumor que praticaram exercício físico, seja ele de força ou natação, tiveram resposta atenuada ao aumento de TAGs no plasma, indicando que o aumento da lipólise não foi tão acentuado nestes animais. É provável que após o exercício as vias de síntese sejam ativadas, o que levaria a contrabalançar o efeito catabólico promovido pela presença do tumor, onde o resultado final seria a síntese sobrepujando o catabolismo.

5.6 Proliferação de célula tumoral *ex-vivo*

Na figura 6 estão apresentados os dados referentes a proliferação *ex-vivo* das células tumorais cultivadas durante 24 horas na presença de timidina radiomarcada. No grupo sedentário a proliferação foi de $1458 \pm 30,3$ cpm. Nos grupos de salto e natação a proliferação foi de $1090 \pm 24,3$ cpm e 1026 ± 33 cpm, respectivamente, sendo significativamente menor que dos animais sedentários ($p < 0,001$).

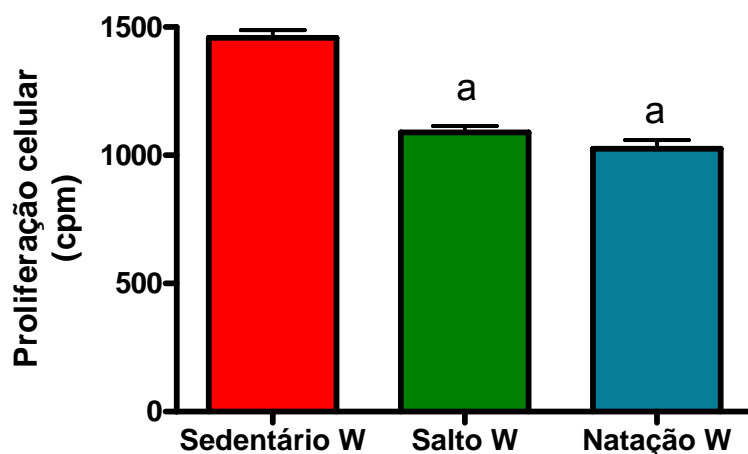


FIGURA 6. Proliferação de célula tumoral *ex-vivo* (cpm – contagem por minuto) obtida dos ratos dos grupos sedentário W, exercício de salto W e exercício de

natação W. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário W.

A diminuição da proliferação das células tumorais cultivadas ex-vivo é um indicativo muito importante no balanço entre proliferação e morte celular, que acarreta diretamente no quadro geral do hospedeiro. As células tumorais obtidas dos animais exercitados apresentaram capacidade proliferativa em meio de cultivo significativamente menor ($p < 0,001$) que à das células provenientes do tumor de animais sedentários (figura 6). Estes resultados vêm corroborar os já encontrados em outros estudos (KUCZERA, D., 2007; MINUZZI, L.G., 2006; NUNES, E., 2005).

5.7 Lipoperoxidação

A concentração de hidroperóxidos no tecido tumoral (nmol/mg de proteína) está apresentada na figura 6. No grupo sedentário com tumor esta foi de $0,025 \pm 0,004$, no grupo com tumor e exercício de salto e natação foi de $0,178 \pm 0,022$ e $0,364 \pm 0,096$, respectivamente. A concentração no grupo salto foi 7 vezes ($p < 0,05$) e no de natação de 14,5 vezes ($p < 0,001$) maior quando comparados à do grupo sedentário. Os ratos que foram exercitados com o protocolo de natação tiveram um aumento significativo de duas vezes na taxa de hidroperóxidos pelo tecido tumoral quando comparados ao grupo Salto ($p < 0,05$).

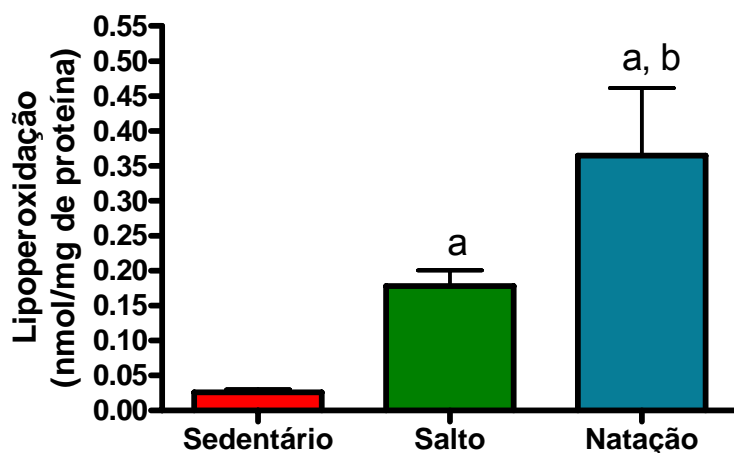


FIGURA 7. Lipoperoxidação no tecido tumoral (nmol/mg de proteína) dos grupos sedentário, exercício de salto e exercício de natação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: significativamente diferente quando comparado ao grupo sedentário ($p < 0,05$ vs. salto e $p < 0,001$ vs. natação).

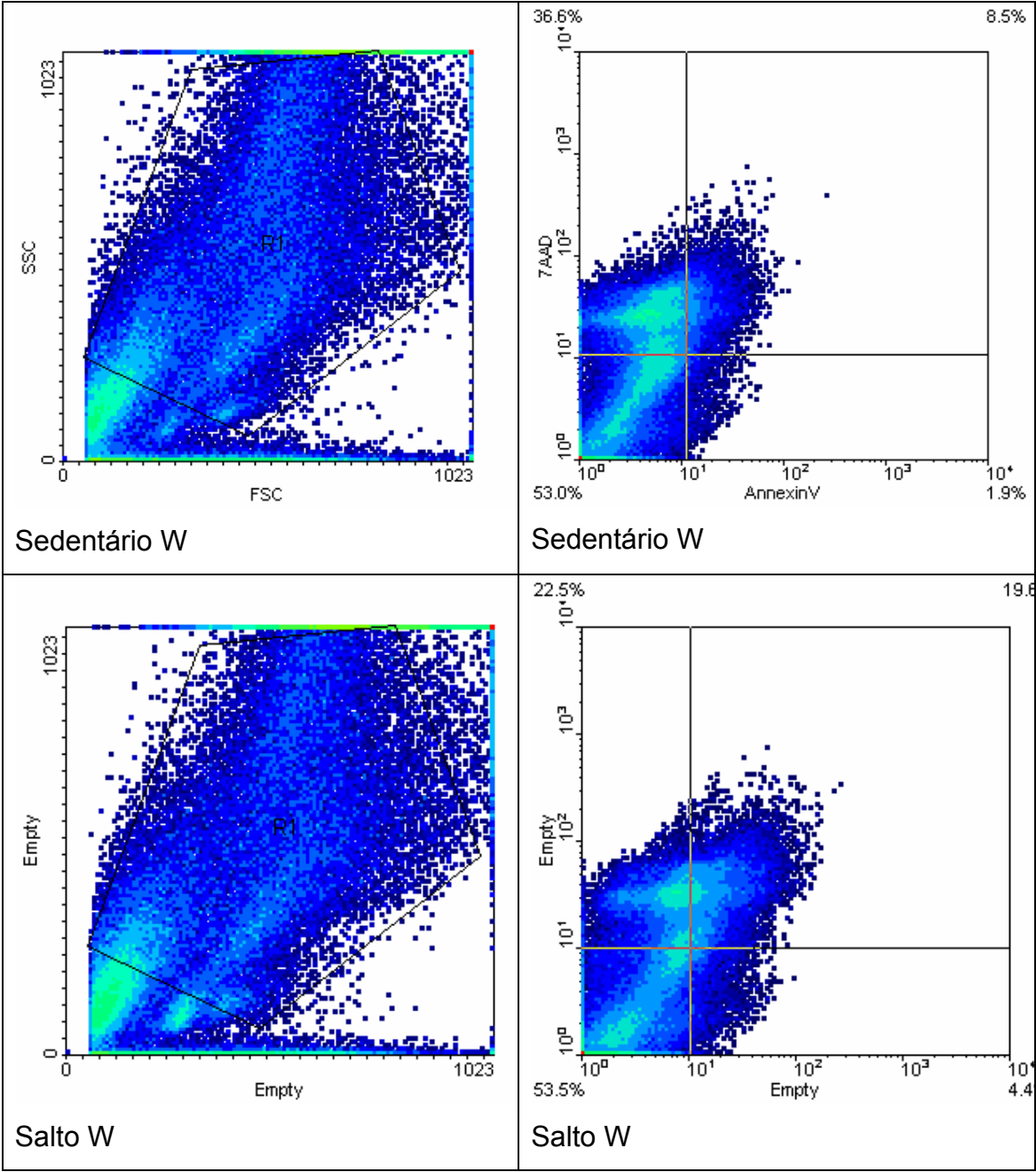
b: significativamente diferente quando comparado ao grupo salto ($p < 0,05$).

O aumento da lipoperoxidação no tecido tumoral de ratos exercitados em relação aos sedentários é de notável importância quando pretende-se avaliar o balanço entre proliferação e morte celular, uma vez que a célula que sofre o processo de peroxidação lipídica entra em apoptose, ou seja, tem uma morte silenciosa, sem causar edema ou inflamação no local, apenas formando vesículas apoptóticas que são prontamente reconhecidas e ingeridas por fagócitos locais (FERRARI, 2000). Outro ponto a ser observado é que as EROs, bem como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) constituem um conjunto importante de agentes indutores de apoptose, promovendo a oxidação dos fosfolipídios da membrana celular, produzindo lipoperóxidos como produto deste processo (FERRARI, 2000). Sabe-se que o câncer é um tipo de doença que atua no organismo de várias formas. Foi demonstrado em trabalhos anteriores que a suplementação com óleo de peixe rico em ômega 3 atua contra o câncer diminuindo a caquexia e o crescimento tumoral. As vias envolvidas foram a diminuição da proliferação das células tumorais, na expressão da enzima COX-2 e conseqüentemente da produção de prostaglandinas E_2 , aumento da peroxidação lipídica e da apoptose das células tumorais (MUND et.al, 2007). A hipótese levantada no presente estudo é que o aumento na produção de EROs gerada pelo exercício físico estaria atuando de maneira prejudicial nas células tumorais, que possuem quantidade de mitocôndria reduzida, produzem menos EROs e tem a defesa antioxidante menos eficiente do que outros tipos celulares (LU, 2007). Neste caso o exercício estaria melhorando o sistema de defesa antioxidante de outros tecidos do organismo de forma a proteger do estresse oxidativo causado por ele, porém o tecido tumoral não se beneficiaria deste processo. A concentração de lipoperóxidos é de 7 vezes e 14, 5 vezes maior no tecido tumoral dos ratos exercitados com salto e natação, respectivamente, quando comparados ao sedentário, indicam que o aumento do estresse oxidativo foi capaz de atuar no local do tumor danificando a membrana celular de maneira que esta desencadeie a cascata de sinalização para apoptose. Estes dados (figura 7) corroboram com os da literatura que afirma ser o exercício físico um gerador de estresse oxidativo, estando relacionado com o aumento da peroxidação lipídica e desempenhando importante papel como indutor da apoptose (GAGO-DOMINGUEZ, et.al.; 2006, AYRES, et.al, 1998).

5.8 Células do tecido tumoral analisadas em citometria de fluxo.

Na figura 8 esta a ilustração representativa de como se obteve os dados para análise de apoptose e necrose das células tumorais. Na coluna da esquerda, no eixo x, as células são identificadas por tamanho (FSC – Forward Scatter) e no y por granulosidade (SSC – side scatter). Na coluna da direita, os gráficos representam as células que estavam dentro de “gate” R1, sendo o eixo x a leitura para anexina V, marcando a apoptose e no eixo y para marcação com 7AAD, identificador de necrose. Os resultados estão apresentados nas figuras 9 e 10.

Tamanho vs. Granulosidade	Anexina V vs. 7AAD
---------------------------	--------------------



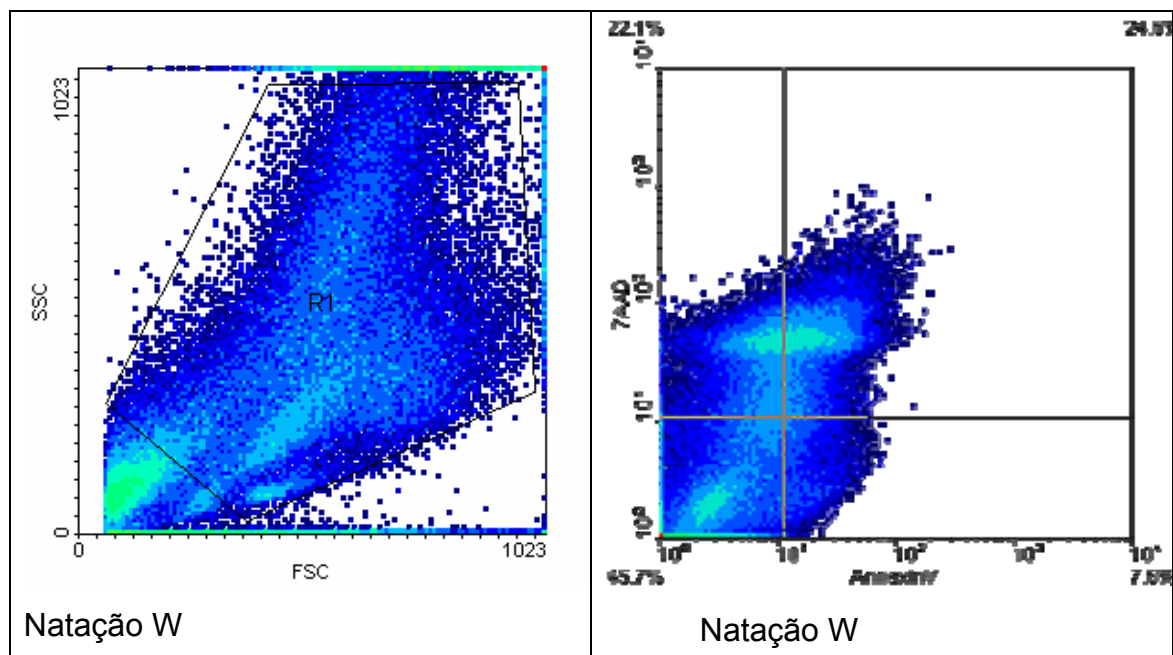


FIGURA 8: Na coluna da esquerda, a distribuição das células tumorais quanto a seu tamanho e granulosidade, na coluna da direita, a distribuição das células quanto a sua marcação com 7AAD e Anexina V. Células provenientes dos tumores de ratos sedentários, treinados com salto e treinados com natação.

5.9 Células em necrose

A figura 9 mostra que o percentual de células necrosadas provenientes da massa tumoral de ratos sedentários W foi de $40,6 \pm 2,2\%$, de $28,4 \pm 1,8\%$ nos ratos exercitados com salto e de $20,8 \pm 2\%$ nos exercitados com natação W. A percentagem de células necrosadas no grupo salto W foi 30% menor que a do sedentário W ($p < 0,01$). O grupo natação W teve percentagem de células 50% menor à dos sedentário W ($p < 0,01$) e 27% menor que no salto W ($p < 0,05$).

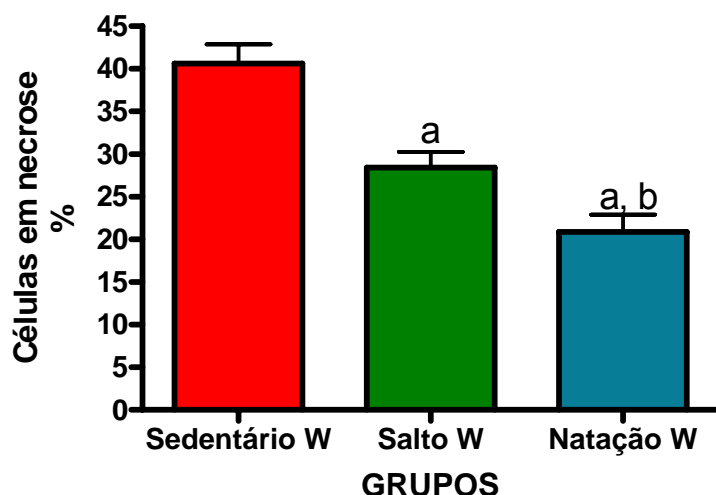


FIGURA 9. Porcentagem de células mortas por necrose (marcadas por 7AAD) obtidas a partir do tecido tumoral nos ratos dos grupos sedentário, exercício de salto, exercício de natação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: salto W $p < 0,01$ e natação W $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário W.

b: natação W $p < 0,05$ quando comparado ao grupo salto W

5.10 Células em apoptose

O percentual de células tumorais que foram marcadas com Anexina V, indicando estarem em apoptose foi de $2,58 \pm 0,16$ nos ratos sedentários, $6,10 \pm 0,18$ nos ratos exercitados com salto e $10,84 \pm 1,46$ nos exercitados com natação. Os ratos exercitados têm maior percentual de apoptose no tecido tumoral em relação ao controle sedentário, sendo 2,3 vezes maior no grupo de salto ($p < 0,05$) e 4,2 vezes maior no grupo natação ($p < 0,001$). Dos exercícios, a natação foi mais eficiente em induzir a apoptose em que esta foi 1,8x maior que a do grupo submetido ao exercício de força ($p < 0,01$).

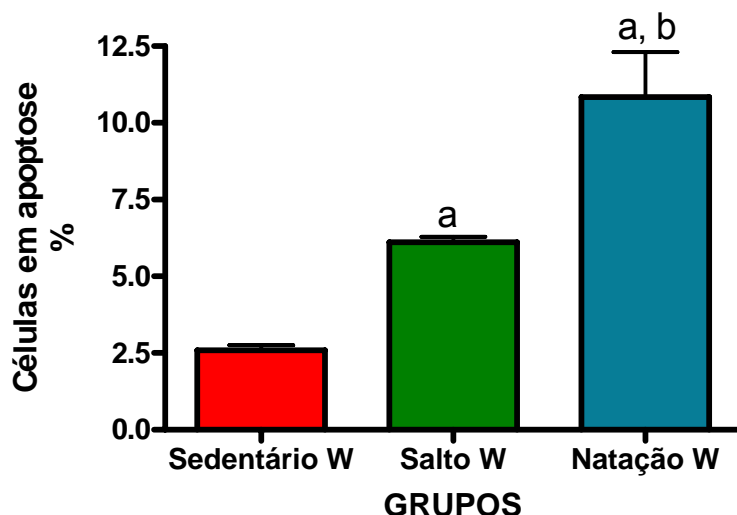


FIGURA 10. Porcentagem de células em apoptose (marcadas por Anexina V) no tecido tumoral nos ratos dos grupos sedentário, exercício de salto, exercício de natação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: salto $p < 0,05$ e natação $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário.

b: $p < 0,01$ quando comparado ao grupo salto.

Os resultados mostram que o exercício foi capaz de diminuir o percentual de células em necrose e aumentar o de células em apoptose no tecido tumoral. Este fenômeno se mostra ainda mais acentuado quando analisa-se o resultado do exercício de natação em comparação com o exercício de salto e com o grupo sedentário. Este fato parece ser devido a um maior estresse oxidativo gerado pelo exercício aeróbico quando comparado ao anaeróbico.

O elevado percentual de apoptose no tecido tumoral dos ratos exercitados pode ser interpretado como um fator positivo no controle da proliferação celular, pois sabe-se que a apoptose, diferente da necrose, é um mecanismo do corpo em busca da homeostasia. O exercício físico tem demonstrado ser capaz de diminuir a proliferação celular, por meio da apoptose, em células neoplásicas (LEUNG et al., 2004). Acredita-se que mudanças nas concentrações séricas de IGF-1 e da sua proteína ligante IGFBP-1 possam aumentar o conteúdo da proteína p53 no tumor, a qual tem função de proteger o genoma de mutações e alterações genéticas. A p53 tem função de ativar genes ou fatores que causam a parada do ciclo celular ou que

façam a célula entrar em apoptose a partir da transcrição de genes de proteínas pró-apoptóticas nos casos em que ocorram erros na transcrição de DNA. O aumento na expressão da proteína p53 no tecido tumoral altera de forma positiva a relação entre Bax e bcl-2, o que desencadeia a morte celular programada (JIANG; WANG, 2000). O exercício físico parece ser uma importante intervenção na terapia contra o câncer, pois tem a propriedade de reduzir o estímulo de proliferação e aumentar a taxa de apoptose nas células tumorais.

5.11 Expressão de proteínas no tecido tumoral

Para dar continuidade na investigação dos mecanismos pelos quais o exercício físico estaria atuando no controle da massa tumoral foram analisadas a expressão das proteínas Bax e Bcl-2. As proteínas membros da família Bcl-2 são importantes reguladoras da apoptose com membros que podem suprimir (Bcl-2) ou promover (Bax) a morte celular programada (MARSH et.al, 2005).

5.11.1 Expressão da proteína Bax (pró-apoptótica)

A figura 11 mostra que os grupos exercitados tiveram aumento na expressão da proteína Bax no tecido tumoral quando comparado à do grupo sedentário W. Os valores (unidades arbitrárias) ficaram em $153,5 \pm 2,7$ nos tumores de ratos sedentários W, $175,2 \pm 5,4$ nos ratos do grupo salto W e $171,5 \pm 3,1$ nos ratos da natação W. O grupo salto teve aumento de 14% ($p < 0,01$) e o grupo natação um aumento de 11% ($p < 0,05$) em relação ao sedentário W.

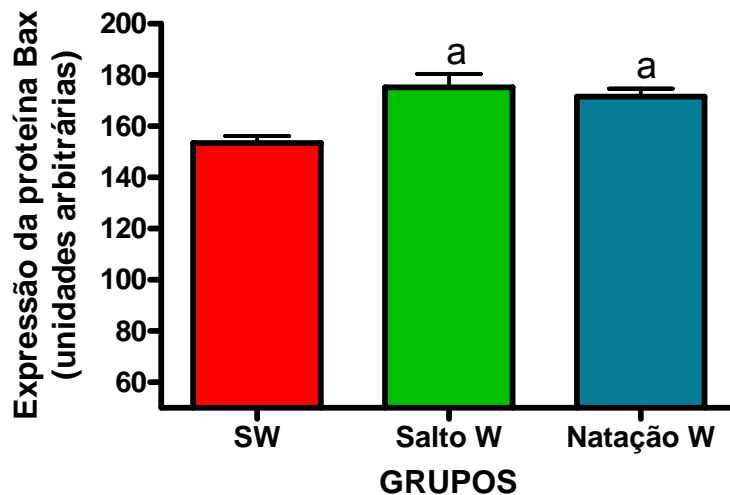
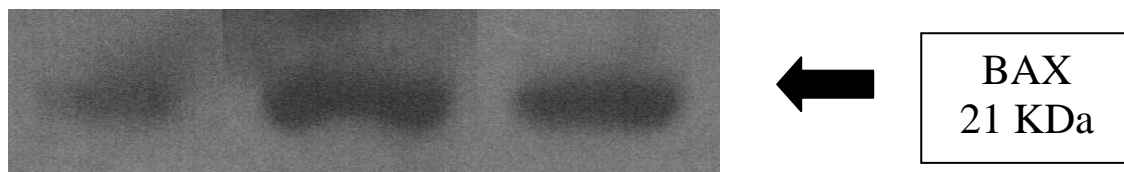


FIGURA 11. Expressão da proteína Bax no tecido tumoral dos ratos dos grupos sedentário, exercício de salto, exercício de natação. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: salto W $p < 0,01$ e Natação W $p < 0,05$ quando comparados ao grupo sedentário.

5.11.2 Expressão da proteína Bcl-2 (anti-apoptótica)

A expressão da Bcl-2 (unidades arbitrárias) foi de $176,2 \pm 2,6$ no grupo sedentário, $148,5 \pm 7,7$ no grupo exercitado com salto e $137,9 \pm 7$ no grupo natação (figura 13). Estes dados mostram um comportamento antagônico ao da Bax, representando diminuição de 16% ($p < 0,05$) no grupo Salto e 22% ($p < 0,01$) no grupo natação quando comparados ao Sedentário.

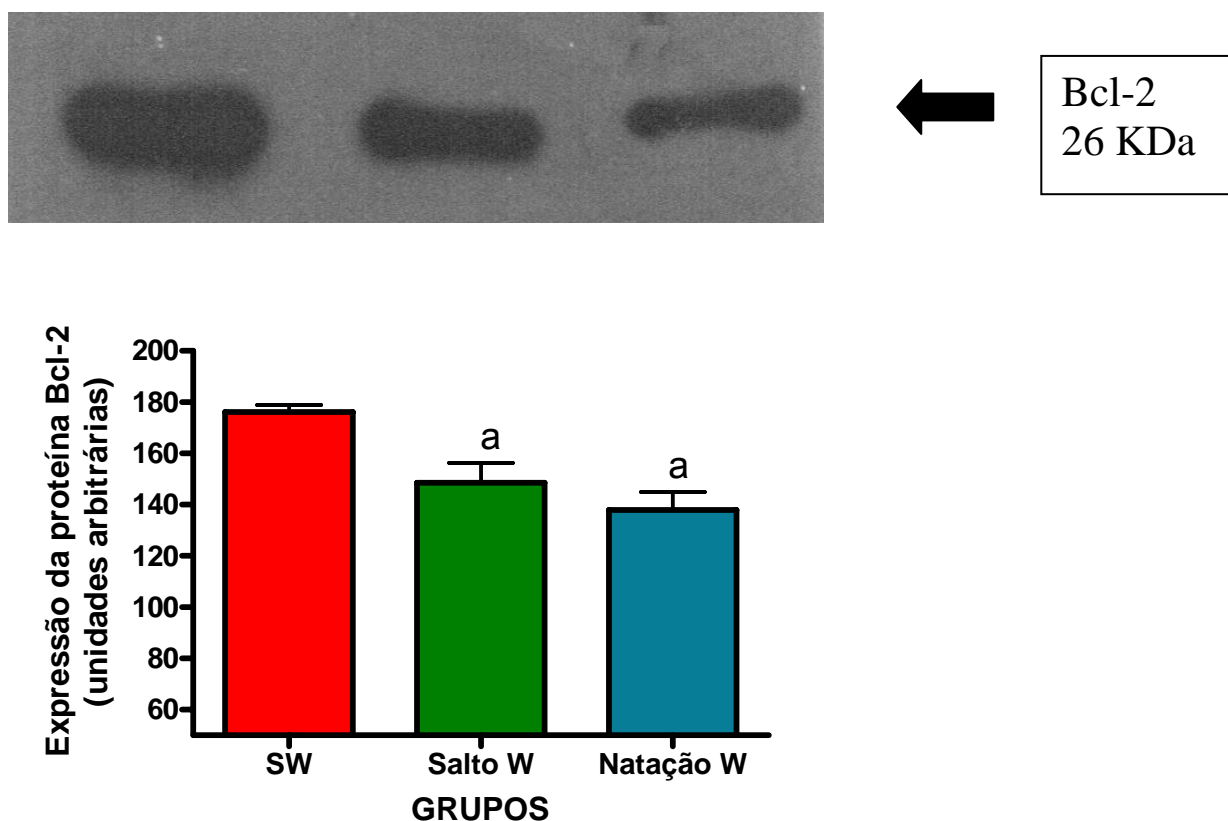


FIGURA 12. Expressão da proteína Bcl-2 no tecido tumoral dos ratos dos grupos sedentário W (SW), exercício de salto W, exercício de natação W. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: salto W $p < 0,05$ e natação W $p < 0,01$ quando comparado ao SW.

As proteínas da família Bcl-2 são importantes reguladoras da apoptose com membros que podem suprimir (Bcl-2) ou promover (Bax) a morte celular programada. As espécies reativas de oxigênio são capazes de induzir a apoptose *in vitro* e isto se caracteriza pela translocação intracelular da Bcl-2 e Bax (MARSH et.al., 2005).

As figuras 11 e 12 mostram que ambos os tipos de exercício foram hábeis em promover um balanço pró-apoptótico no tecido tumoral, aumentando a expressão da proteína Bax e diminuindo significativamente a expressão de Bcl-2, que estaria protegendo as células deste processo. Este fato é importante visto que o mecanismo de apoptose seria um regulador natural do

corpo, procurando encontrar a homeostasia e impedir o crescimento desordenado das células tumorais.

Os resultados da expressão de Bax e Bcl-2 encontrados no presente trabalho corroboram com os de KUCZERA (2007) que demonstrou a diminuição da expressão de Bcl-2 e o aumento da Bax nos ratos exercitados com salto quando comparados aos seus controles sedentários.

5.11.3 Expressão da proteína PIF (Fator indutor de proteólise)

Os valores de expressão do PIF (unidades arbitrárias) foram de $185,8 \pm 1,5$ no tumor de ratos sedentários W, $171,3 \pm 2,6$ nos exercitados com salto W e $163,2 \pm 3,6$ nos ratos do grupo natação W (figura 14). A expressão da proteína PIF estava maior no tecido tumoral dos ratos sedentário com tumor do que nos exercitados com tumor, havendo redução de 8% ($p < 0,05$) no grupo salto W e 12% ($p < 0,001$) no grupo natação W.

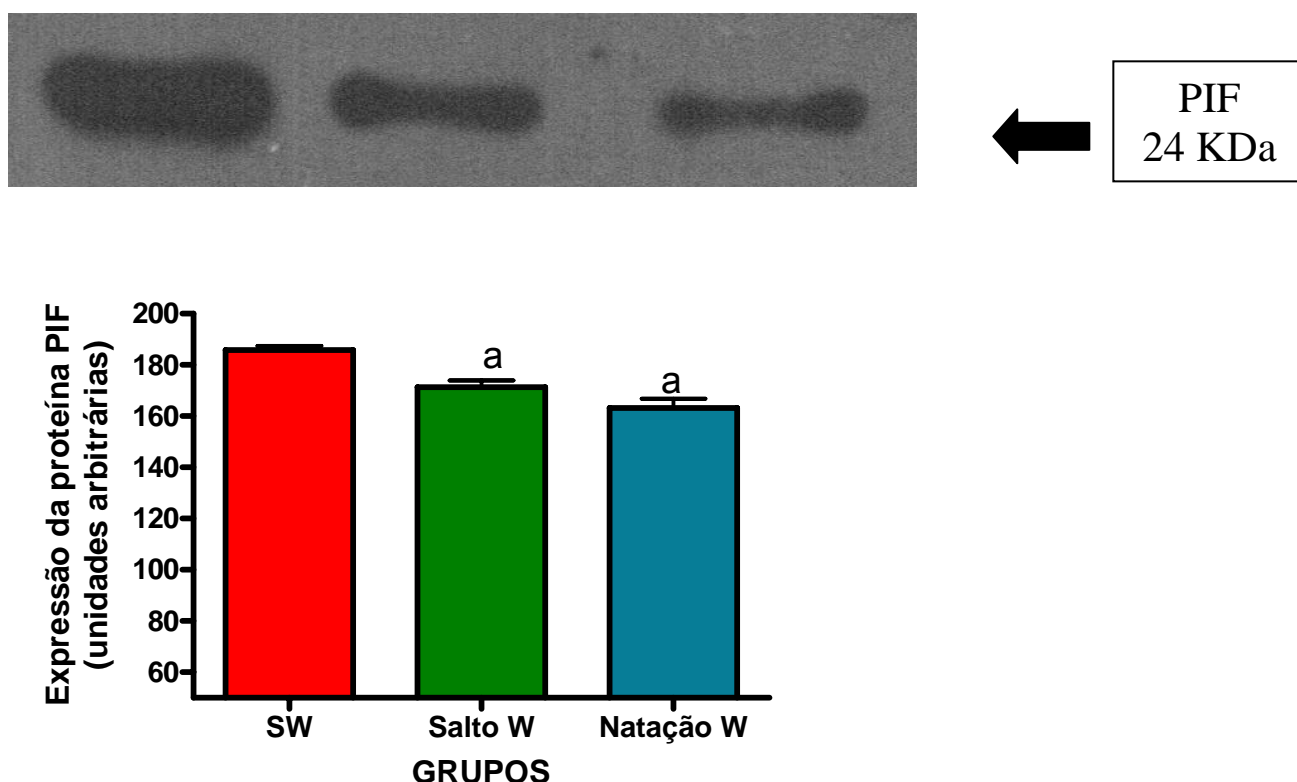


FIGURA 13. Expressão da proteína PIF no tecido tumoral dos ratos dos grupos sedentário W (SW), exercício de salto W, exercício de natação W. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 4 experimentos diferentes.

a: salto W $p < 0,05$ e Natação W $p < 0,001$ quando comparado ao grupo sedentário W.

Com estes resultados pode-se observar a atuação do exercício físico reduzindo a expressão de PIF e com isso atenuando a degradação protéica, sendo assim provavelmente um dos fatores responsáveis por influenciar a menor perda de peso corporal nos animais exercitados.

A atuação do PIF como agente proteolítico é bem demonstrada em pesquisas que mostram a presença de PIF circulante no músculo esquelético de pacientes com câncer e perda de peso maior que 10%. Quando administrado em camundongos com injeção intravenosa, o PIF produziu rápida diminuição no peso corporal (cerca de 10% de perda de peso em 24 horas) sem redução na ingestão de comida ou água (TISDALE, 2001; SKIPWORTH, et.al.; 2007).

6. CONCLUSÃO

O treinamento com exercício físico tanto anaeróbico, utilizando o protocolo de salto, quanto o aeróbico, através do uso da natação, fora, eficientes em evitar a perda de peso, bem como na redução do peso do tumor, da hiperlactatemia e hipertriacilglicerolemia.

Ambos os tipos de exercício físico, foram igualmente hábeis em diminuir a proliferação de células tumorais *ex-vivo*.

A concentração de lipoperóxidos no tecido tumoral, nos dois tipos de exercício foram expressivamente maiores que no grupo sedentário, porém os animais que executaram o protocolo de exercícios aeróbicos tiveram a concentração de lipoperóxidos ainda maior que no grupo do exercício anaeróbico. Essa diferença entre os animais do grupo do protocolo de salto em relação aos da natação manteve-se nos resultados de apoptose e necrose das células tumorais.

O exercício físico aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e diminuiu a expressão da anti-apoptótica Bcl-2.

Os animais exercitados apresentaram diminuição da expressão de PIF, evitando a diminuição da massa muscular.

Em resumo, a redução do crescimento tumoral e caquexia seja pelo exercício físico de salto ou natação, e acompanhada pelo aumento da peroxidação lipídica no tumor, redução da proliferação celular e elevação da apoptose, possibilitada pela elevada expressão do mediador intracelulares Bax e redução de Bcl-2 e PIF.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E.E. The growth of the carcinosarcoma of Walker 256

in the ascitic form. **Experimentia**, v. 24, p. 166-167, 1968.

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**, 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

AL-MAJID, S.; MCCARTHY, D.O. Cancer-induced fatigue and skeletal muscle wasting: The role of exercise. **Biolog. Res. Nurs.** 2(3): 186-197, 2001.

American College of Sports Medicine. **Programa de condicionamento físico da ACSM**, 2.ed. São Paulo: Manole, 1999.

ARGILÉS, J.M.; LOPES-SORIANO, F.J.; BUSQUETS, S. Novel approaches to the treatment of cachexia. **Drug Discorery**. 2007.

ARGILÉS, J.M.; ALVAREZ, B.; LOPES-SORIANO, F.J. The metabolism basis of cancer cachexia. **Med. Res. Rer.** 17(5):477-98, 1997.

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C. *et.al.* Mediators involved in the câncer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**. 21: 977-985, 2005a.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; 37:1609-1619, 2005b.

ARGILÉS, J. M.; MOORE-CARRASCO, R.; FUSTER, G.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Câncer caquexia: the molecular mechanisms. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**; 35: 405-409, 2003.

ARGILÉS, J.M.; LOPEZ-SORIANO, F.J. The role of cytokines in cancer cachexia. **Med. Res. Rev.** 19:223-248, 1999.

BACURAU, R. F. P.; BELMONTE, M. A.; SEELAENDER, M. C. L.; COSTA ROSA, L.

F. B. P. Effect of a Moderate Intensity Exercise Training Protocol on the Metabolism

of Macrophages and Lymphocytes of Tumor-bearing Rats. **Cell Biochemistry and**

Function, v. 18, p. 249-258, 2000.

BARBER, M.D.; ROSS, J.A.; FEARON, K.C.H. Cancer cachexia. **Surg. Oncology**.

8:133-141, 1999.

BEGIN ME., HORROBIN DF. Selected fatty-acids as possible second messengers for drug-induced cyto-toxicity. **Anticancer Research**. V. 5, p. 589, 1985.

BEGIN ME, ELLS G., DAS UN, H-ORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acids induced cytotoxicity against tumor cells and its relationship to lipid peroxidation. **J Natl. Cancer Inst.** V. 80, p.188-94, 1988.

BLACK J.M.; NESHEIM M.C. and KINSELLA, J.E.. Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma. **British Journal of Nutrition**, v.1, p. 283-294, 1994.

BLOOMER, Richard J.; GOLDFARB, Allan H. MCKENZIE, Michael J. Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Medicine and Science in Sports and Exercise* : 1098-1105, 2006.

BOECKH-HAEBISCH, E.M., FERNANDES, L.C.; PONZONI, M.; SEELANDER M.C., and CURI, R.. Cationic and water content in blood, skeletal muscle and liver of food restricted and Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Research Therapy and Control**, v.5, p. 213-219, 1998.

BOUDREAU, M.D.; SOHN, K.H; RHEE, S.H.; LEE, S.W.; HUNT, J.D.; HWANG, D.H. Suppression of tumor cell growth both in nude mice and in culture by n-3 polyunsaturated fatty acids: mediation through cyclooxygenase-independent pathways. **Cancer Research**, v. 61, p. 1386-1391, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.142,p. 79-83, 1976.

BRIGATI, C.; NOONAN, D.M.; ALBINI, A.; BENELLI, R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clin Exp Metastasis**.;19(3):247-58, 2002 (Abstract).

BRITO, G.A.P. **Estudo da transferência lipídica de linfócitos para o músculo esquelético exercitado**. Curitiba (PR): Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2005.

CALDAROLA, L.; DEI POLI, G.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. **Oncology**, v.10, p. 246-249, 1968.

CHEESEMAN, K.H.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.V. et al. Lipid peroxidation and lipid antioxidant in normal and tumor cells. **Toxicology Pathology**, v. 12, p. 235-9, 1984.

CHEN, H.; CHU, R.Y.; HSU, P.; LU, J.; LAI, K.; TSENG, H.; CHOU, N.; HUANG, M.; TSENG, C.; HSIAO, M. Loss of e-cadherin expression correlates with poor differentiation and invasion into adjacent organs in gastric adenocarcinoma. **Cancer Letters**, v. 201, p. 97-106, 2003.

CHULADA, P. C.; THOMPSON, M. B.; MAHLER, J. F.; DOYLE, C. M.; GAUL, B. W.; LEE, C.; TIANO, H. F.; MORHAM, S. G.; SMITHIES, O.; LANGENBACH, R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. **Cancer Research**, v.60, p. 4705-4708, 2000.

CLARKSON, M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **The American Journal of Clinical Nutrition**; 72 (suppl): 637S-46S, 2000.

COSTA ROSA, L.F.B.P. Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic Disease: a Complementary Treatment Strategy. **eCAM**. 1(1)63-70, 2004.

COURNEYA, K.S.; FRIEDENREICH, C.M. Physical exercise and quality of life following cancer diagnosis: a literature review. **Ann. Behav. Med.** 21:171-9, 1999.

COURNEYA, K.S.; KEATS, M.R.; TURNER, A.R. Physical exercise and quality of life in cancer patients following high dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. **Psychooncology**, 9 (2):127-36, 2000.

COURNEYA, K.S.; BLANCHARD, C.M.; LAING, D.M. Exercise adherence in breast cancer survivors training for a dragon boat race competition: a preliminary investigation. **Psychooncology**, 10 (5):444-52, 2001.

COURNEYA, K.S.; SEGAL, R.J.; REID, R.D.; JONES, L.W.; MALONE, S.C.; VENNEN, P.M.; PARLIAMENT, M.B.; SCOTT, C.G.; QUINNEY, H.A.; WELLS, G.A. Three independent factors predicted adherence in a randomized controlled trial of resistance exercise training among prostate cancer survivors. **J Clin Epidemiol.** 57 (6):571-9, 2004.

COURNEYA, K.S.; FRIEDENREICH, C. M. Physical activity and cancer control. **Seminars in Oncology Nursing**. v. 23(4) p.242-252, 2007.

CURI, R. **Glutamina - metabolismo e aplicações clínicas e no esporte**. Rio de Janeiro: SPRINT, 2000. 261 p.

CURI, R; POMPEIA, C, MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a Gordura**: os ácidos graxos. Editora Manole, São Paulo, 2002.

DAS UM, HUANG YS, BEGIN ME, et al., Uptake and distribution of cis-unsaturated fatty acids and their effect on free radical generation in normal and tumor cells in vitro. **Free Radiological and Biological Med.**, v. 3, p. 9-14, 1987.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H. J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v.127, p.411-417, 2001.

DIMEO, F.C.; RUMBERGER, B.G.; KEUL, J. Aerobic exercise as a therapy for cancer fatigue. **Med Sci. Sports Exerc.** 30: 475-477, 1998.

DORMANDY, T.L.. An approach to free radicals. **Lancet**, ii p. 1010-4, 1983.

DUNLOP, R.J.; CAMPBELL, C.W. Cytokines and advanced cancer. **J. Pain Symptom Manage.** 20:214-232, 2000.

EARLE, E.R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256, in vitro and in vivo. **American Journal Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935

ENGLE; JONES, J. B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline Hydrazine buffers, improved conditions of L-glutamate, L-Lactate, and other metabolites. **Annals of Biochemistry**, 88:475-484, 1978.

FERNANDES, L.C.; NOGUEIRA C.R.; MACHADO, U.F; CARPINELLI, A.R., and CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **American Journal of Physiology**, v.258, p. E1033-E1036, 1990.

FERNANDES, L.C.; CARPINELLI, A.K.; HELL, N.S.; CURI, R. Improvement of cancer cachexia and inhibition of tumor growth by insulin administration in rats. **Cancer Ther. Control.** 1:259-268, 1991.

FERNANDES, L.C. **Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos**. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, 1995.

FERRANDO, A.A.; TIPTON, K.D.; BAMMAN, N.M.; WOLFE, R.R. Resistance exercise maintains skeletal muscle protein synthesis during bed rest. **Journal Appl. Physiology**. 82:807-810, 1997.

FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Natl. Cancer Institute**, v. 82, p. 4-5, 1990.

FRIEDENREICH, C., AND ORENSTEIN, M. .Physical Activity and Cancer Prevention: Etiologic Evidence and Biological Mechanisms.. **Journal of Nutrition** 132: 3456S-3464S, 2002.

GAGO-DOMINGUEZ, Manuela; JIANG, Xuejuan; CASTELAO, J. Esteban. Lipid Peroxidation and protective effect of physical exercise on breast cancer. *Medical Hypotheses...*, 2006.

GOBATTO, C.A., SIBUYA, C.Y., AZEVEDO, J.R.M., LUCIANI, E., KOKUBUN, E., MELLO, M.A.R. Caracterização da intensidade de exercício e do efeito de treinamento físico no modelo de natação de ratos wistar. **Motriz**, v7(1), p.s57 – s62, 2001.

GOMEZ-CABRERA, M. C., DOMENECH, E.; JI, L.L., VIÑA, J.. Exercise as an antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. **Science & Sports**, 21(85-89), 2006.

GUAITANI A. Two lines of Walker carcinoma 256: their peculiarities and different interactions with the host. **Tumori**. 1983; 69: 1-9.

HESPEL, P.; OP'T EIJNDE, B.; VAN LEEMPUTTE, M.; URSO, B.; GREENHAFF, P. L.; LABARQUE, V.; DYMARKOWSKI, S.; VAN HECKE, P.; RICHTER, E. A. Oral creatine supplementation facilitates the rehabilitation of disuse atrophy and alters the expression of muscle myogenic factors in humans. **Journal of Physiology**, v. 536.2, p. 625-633, 2001.

HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **J. Appl. Physiol**. 56:831-838, 1984.

HORROBIN, D.F. Loss of Δ -6 desaturase activity as a key factor in ageing. **Age**, v.4, p. 139, 1981.

HORROBIN, D.F. Essential fatty acids, lipid peroxidation and cancer. New York, 1990.

IÑIGUEZ, M.A.; RODRÍGUEZ, A.; VOLPERT, O.V.; FRESNO, M.; REDONDO, J.M.

Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. **Trends Mol Med.**, v.2, p. 73-8, 2003.

Instituto Nacional de Câncer – INCA - Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Brasil. **Ministério da Saúde** Rio de Janeiro: INCA, 2006.

Jl, L. L. Exercise induced modulation of antioxidant defense. **Annals of New York Academy of Science** , v. 959, p. 82-92, 2002.

Jl, L.L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. **Experimental Gerontology**. v.42 p.582-593, 2007.

JIANG, Z.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. **J. Biol. Chem.** 275: 31199–31203, 2000.

KIM, H.J.; WU, H.; PARK, I.A.; HÁ, S.W.. High cyclooxygenase-2 expression is related with distant metastasis in cervical cancer treated with radiotherapy. **Journal Radiation Oncology Biology**, v. 55, p. 16-20, 2003

KOKUBUN, E. **Interações entre o metabolismo de glicose e ácidos graxos livres em músculo esquelético**. São Paulo, Tese de Doutorado. USP, 1990.

KOSTKA, T.; DRAI, J.; BERTHOUSE, S.E.; LACOUR, J.R.; BONNEFOY, M. Physical activity, fitness and integrated antioxidant system in healthy active elderly women. **Internacional Journal Sports Medicine**. 19:462-7, 1998.

KUCZERA,D. Suplementação crônica da dieta com β-Hidroxi β-metilbutirato (HMB) e treinamento contra-resistido reduzem a taxa de crescimento do tumor de Walker 256 – Identificação dos mediadores participantes neste processo. 2007. **Dissertação de Mestrado**. UFPR, Curitiba/PR.

LEE, I-MIN. Physical Activity And Cancer Prevention . Data From Epidemiologic Studies. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 11, p. 1823-1827, 2003.

LEUNG, P.S.; ARONSON, W. J.; NGO, T.H.; GOLDING, L. A.; BARNARD, R. J.

Exercise alters the IGF axis in vivo and increases p53 protein in prostate tumor cells

in vitro. **Journal Appl Physiol**, 96: 450 . 454, 2004.

LEIGHTON, B.; COOPER, G.J.S. Pancreatic amylin and calcitonin gene-related

peptide cause resistance to insulin in skeletal muscle in vitro. **Nature**, 335:632-635, 1989.

LLOR, X.; PONS, E.; ROCA, A.; ALVAREZ, M.; MAÑE, J.; FERNANDEZ, F.; GASSULL, M. A.. The effects of fish oil, olive oil, oleic acid and linoleic acid on colorectal neoplastic processes. **Clinical nutrition**, v. 22(1), p. 71-79, 2003

LU, S.; ZHANG, X.; BADAWI, A.F.; SOHEMY, A.; ARCHER, M.C. Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib promotion of mammary tumorigenesis in rats fed a high diet rich in n-6 polyunsaturated fatty acids. **Cancer Letters**, v. 184, p. 7-12, 2002.

LU, F. Reactive oxygen species in cancer, too much or too little. **Medical Hypotheses**, 2007.

MacVICAR, M.G., WINNINGHAM, M.L.; NICKEL, J.L. Effect of aerobic interval training on cancer patients: functional capacity. **Nurs. Res.** v.38, p.348-351, 1989

MARSH, Susan A., LAURSEN, P. B., PAT. B.K., GOBE, G.C., COOMBES, J.S. Bcl-2 in endothelial cells is increased by vitamin E and α -lipoic acid supplementation but not exercise training. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 38:445-451, 2005.

MILAN, A., HUERTA, S., Apoptosis-Inducing Factor and Colon Câncer. **Journal of Surgical Research**, 2007.

MINUZZI, Luciele Guerra. Estudo da associação d exercício físico com a suplementação com óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e imunidade em ratos com tumor de Walker 256. Curitiba –PR: Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2006.

MUND, R. C.; PIZATO, Natalia; BONATTO, Sandro; NUNES, Everson A.; VICENZI, Thiago; TANHOFFER, Ricardo; OLIVEIRA, Heloisa H.P.; CURI, Rui; CALDER, Philip C.; FERNANDES, L.C. Decreased tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats cronically supplemented with fish oil involves COX-2 and PGE2 reduction associated with apoptosis and increased peroxidation. **Prostaglandins, Leukotrienes and fatty Acids**, 76 (113-120), 2007.

NOUROOZ-ZADEH, Z.; TAJADDINI-SARMANDI, J.; WOLFF, S.P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, 220 (403-409), 1994.

NUNES, E. A. **Efeitos do treinamento de saltos e da suplementação com betahidroxi-beta-metilbutirato (HMB) sobre o crescimento tumoral, caquexia e parâmetros imunitários de ratos portadores do tumor de Walker 256.** Curitiba (PR): Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 2005.

Organização Mundial da Saúde, **Doenças Crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. Organização Pan-Americana da Saúde – OMS. Brasília, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: <http://www.opas.org.br>. Acesso em 2005.

PASTERNAK, J. J. **Genética Molecular Humana**. Mecanismos de Doenças hereditárias. Manole 1.ed. p.365-412, 2002.

PEREIRA, B.; SOUZA, T. P. **Metabolismo celular e exercício físico**: aspectos bioquímicos e nutricionais. Phorte: São Paulo, 2004

PINTO JR., J. A.; FOLADOR, A.; BONATO, S.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.;

NISHIYAMA, A.; FERNANDEZ, R.; CURI, R.; FERNANDEZ, L. C. Fish oil supplementation in f1 generation associated to naproxen, clenbuterol and insulin administration reduce growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15:358-365, 2004.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; YAMAZAKI, R.K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R.C.; NUNES, E.A.; PICONCELLI, M.; NALIWAIKO, K.; CURI, R.; CALDER, P.C.; FERNANDES, L.C. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutr Cancer**.53(2):194-201, 2005.

ROUBENOFF, R.; McDERMOTT, a.; WEISS, L.; SURI, J.; WOOD, M.; BLOCH, R.;

GORBACH, S. Short-term progressive resistance training increases strength and lean body mass in adults infected with human immunodeficiency virus. **AIDS**. 13:231-239, 1999.

SÁEZ, Maria del Carmem; BARRIGA, Carmem; GARCÍA, Juan José; RODRÍGUEZ, Ana Beatriz; ORTEGA, Eduardo. Exercise-induced stress enhances mammary tumor growth in rats: Benefical effect of the hormone melatonin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2006. ???

SAINI, Amarjit; NASSER, Al-Shant; STEWART, Claire E.H. Waste management – Cytokines, growth factors and cachexia. **Cytocine & Growth Factors Reviews** 17:475-486, 2006.

SEELANDER M.C., AMBRICO, C.; RODRIGUES, M.C.P.S.; BOECKH-HAEBISCH, E. and CURI, R.. Hormonal alterations in Walker 256 tumor-bearing rats: possible role of calcium for the maintenance of cachexia. **Cancer Research Therapy and Control**, v.5, p. 29-33, 1996.

SEGAL, R.J.; REID, R.D.; COURNEYA, K.S.; MALONE, S.C.; PARLIAMENT, M.B.;

SCOTT, C.G.; VENNER, P.M.; QUINNEY, H.A.; JONES, L.W.; SLOVINEC D.ANGELO, M.E.; WELLS G.A. Resistance Exercise in Men Receiving Androgen

Deprivation Therapy for Prostate Cancer. **Journal Clin Oncol.** 1: 1653-59, 2003.

SIDDIQUI, R.A.; WILLIAMS, J.F. Interactions of vasopressin and prostaglandin E2 in the development of cancer cachexia. **Medicinal Science**, v. 15, p. 45-46, 1987.

SKIPWORTH, R.J.E.; STEWART, G.D.; DEJONG, C.H.C.; PRESTON, T.; FEARON, K.C.H. Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumour interaction? **Clinical Nutrition**, v.26, p 667-676, 2007

SMITH, J.A.; GRAY, A.B.; PYNE, D.B.; BAKER, M.S.; TELFORD, R.D.; WEIDEMANN, M.J. Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations. **American Journal Physiology.** 270(4 Pt 2):R838-45, 1996.

SMITH, W. L.; DE WITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. **Annual. Rev. Biochem.**, v.69, p. 145-82, 2000.

SPINA, R.J.; CHI, M.M.Y.; HOPKINS, M.G.; NEMETH, P.M.; LOWRY, O.H.; HOLLOSZY, J.O. Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. **Journal Appl. Physiol.** 80:2250-2254, 1996.

SUMITANI, K.; KAMIJO, R.; TOYOSHIMA, T.; NAKANISHI, Y.; TAKIZAWA, K.; HATORI, M.; NAGUMO, M. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 results in inhibition of proliferation of oral cancer cell lines via suppression of prostaglandin E2 production. **Journal of Oral Pathology Medical**, v. 30, p.41-47, 2001.

TAPIERO, H.; NGUYEN BA, G.; COUVREUR, P.; TEW, K.D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 56, p. 215-222, 2002.

TARDON A.; LEE, W. J.; DELGADO-RODRIGUEZ, M.; DOSEMECIM.; ALBANES, D.; HOOVER, R.; BLAIR, A. Leisure-time physical activity and lung cancer: a metaanalysis. **Cancer Causes Control.** 16(4): 389.397, 2005.

TISDALE, M.J. Biology of Cachexia. **J Natl Cancer Inst**; 89:1763-1773, 1997

TISDALE, M.J. Protein loss in cancer cachexia. **Science.** 289:2293-2295, 2000.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and Cachexia. **Nutrition** 17:438 – 442, 2001.

TISDALE, M. J. Cancer cachexia. **Langenbecks Arch Surg**, 389:299-305, 2004.

WEERT T. E.; HOEKSTRA-WEEBERS J.; GROL, B.; OTTER R., ARENDZEN. H.J.;
POSTEMA K.; SANDERMAN R.; SCHANS C. A multidimensional cancer rehabilitation program for cancer survivors: Effectiveness on health-related quality of life **Journal of Psychosomatic Research** 58, p. 485. 496, 2005.

WESTERLIND, K. C. Physical Activity And Cancer Prevention . Mechanisms. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 11, p. 1834-1840, 2003.

WINNINGHAM, M.L.; MacVICAR, M.G. The effect of aerobic exercise on patient reports of nausea. **Oncol. Nurs. Forum**, v.15, p.447-450, 1988.

ZAMBON, A.C.; MCDEARMON, E.L.; SALOMONIS, N.; VRANIZAN, K.M.; JOHANSEN, K.L.; ADEY, D.; TAKAHASHI, J.S.; SCHAMBELAN, M.; CONKLIN, B.R. Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. **Genome Biol.**;4(10):R61, 2003.

ZHANG, Aiquan; WU, Yan; LAI, Helen W.L.; YEW, David T. Apoptosis – A Brief Review. **Neuroembriology** 3: 47-59, 2004.

ZIELINSKI, M. R.; MUENCHOW, M.; WALLIG, M. A.; HORN, P. L.; WOODS, J. A. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. **Journal of Applied Physiology**, 96: 2249-2256, 2004.

ZOPPI, C.C., ANTUNES-NETO, J., CATANHO, F. O., GOULART, L. F., MOURA, N. M., MACEDO, D. V. Alterações em Biomarcadores de Estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Revista Paulista de Educação Física**, 17(2): 119-30, 2003.

YU, B. P. Cellular defensas against damage from reactive oxygen species, **Physiological Reviews**, Washington, v.74, n. 1, p. 139-62, 1994.